



UNIVERSIDADE DE LISBOA

Faculdade de Medicina Veterinária

O PAPEL DA PROTEÍNA AMILÓIDE A SÉRICA COMO FATOR DE PROGNÓSTICO
NA GENGIVOESTOMATITE CRÓNICA NO GATO

PATRÍCIA DA CÂMARA RAMALHO

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

Doutora Maria Teresa da Costa Mendes
Vítor Villa de Brito

Doutora Sandra de Oliveira Tavares de Sousa Jesus

Doutora Lisa Alexandra Pereira Mestrinho

ORIENTADORA

Doutora Lisa Alexandra Pereira Mestrinho

2019

LISBOA





UNIVERSIDADE DE LISBOA

Faculdade de Medicina Veterinária

O PAPEL DA PROTEÍNA AMILÓIDE A SÉRICA COMO FATOR DE PROGNÓSTICO
NA GENGIVOESTOMATITE CRÓNICA NO GATO

PATRÍCIA DA CÂMARA RAMALHO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA VETERINÁRIA

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

Doutora Maria Teresa da Costa Mendes
Vítor Villa de Brito

Doutora Sandra de Oliveira Tavares de Sousa Jesus

Doutora Lisa Alexandra Pereira Mestrinho

ORIENTADORA

Doutora Lisa Alexandra Pereira Mestrinho

2019

LISBOA

AGRADECIMENTOS

À minha família por todas as condições que me proporcionaram para a realização do curso que escolhi. Sem a motivação e apoio que tanto me deram durante estes longos 6 anos, este momento não seria possível.

À minha orientadora, Professora Lisa Mestrinho, por me ter dado a oportunidade de realizar este estudo e por toda a ajuda proporcionada. Por ser um exemplo de profissionalismo e me fazer ambicionar mais.

À Catarina, por toda a paciência, incentivo e apoio incondicional durante esta fase. Obrigada por me fazeres acreditar em mim.

À Jéssica, à Adriana, à Carla e à Maria Inês por serem as melhores companheiras de curso que poderia ter pedido.

A toda a equipa do HEV, um grande obrigado por todos os ensinamentos. Foi um prazer ter estagiado nesta casa.

Um grande agradecimento à equipa da ANIAID por sempre me ter ajudado na concretização deste estudo.

Ainda um grande obrigado a todos os meus colegas de estágio pelo companheirismo durante este percurso.

APOIOS FINANCEIROS

O presente trabalho foi financiado pelo Centro de Investigação Interdisciplinar em Sanidade Animal (CIISA) da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa, através de uma bolsa para projeto de investigação – Refª 018/2019.

RESUMO

O PAPEL DA PROTEÍNA AMILOIDE A SÉRICA COMO FATOR DE PROGNÓSTICO DA GENGIVOESTOMATITE CRÓNICA NO GATO

A proteína amiloide A sérica (SAA) é uma proteína de fase aguda que se encontra elevada em gatos com inúmeras doenças sistémicas.

O objetivo deste trabalho foi testar a hipótese da existência de um estado inflamatório sistémico crónico associado à Gengivoestomatite Crónica Felina (GECF), bem como o interesse da SAA como biomarcador na monitorização da resposta terapêutica em casos de GECF após extrações dentárias.

Foi selecionada uma amostra de 20 gatos: 10 gatos com GECF (grupo de casos) e 10 gatos emparelhados para doença dentária (grupo controlo), ambos sem co-morbilidades diagnosticadas. Os níveis de SAA foram determinados nos dois grupos e comparados. No grupo de casos, o doseamento de SAA foi também analisado em dois momentos pós cirúrgicos (dia 30 e dia 60). Realizou-se o doseamento da SAA através de um kit SAA-8 de ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA).

Todos os gatos do grupo casos apresentavam lesões de bucoestomatite e estomatite caudal, alterações histológicas de inflamação crónica e resultados positivos na análise ao calicivirus felino. Foram observadas concentrações significativamente superiores de SAA nos animais com GECF ($3,9885 \pm 1,377 \mu\text{g/ml}$) relativamente aos gatos controlo ($0,1146 \pm 0,193 \mu\text{g/ml}$) ($p < 0,0001$), revelando a existência de um estado inflamatório sistémico subjacente à GECF. No entanto, apenas em 3 dos 10 casos se verificou uma diminuição nestes valores após as exodontias. Não foram encontradas correlações entre a gravidade das lesões e dos sinais clínicos e a concentração de SAA.

Este estudo revela que a concentração de SAA permanece elevada na GECF independentemente das exodontias. A SAA mostrou ter um eventual papel como indicador de mau prognóstico em animais com GECF.

Palavras-chave: gengivoestomatite crónica felina, proteína amiloide A sérica, gato, extrações dentárias, calicivirus felino, biomarcador.

ABSTRACT

THE ROLE OF SERUM AMILOID A AS A PROGNOSTIC FACTOR IN FELINE CHRONIC GINGIVOSTOMATITIS

Serum amyloid A (SAA) is an acute phase protein that is frequently increased in cats with several systemic diseases.

The aim of this study was to test the hypothesis of the existence of a chronic inflammatory systemic condition associated to Feline Chronic Gingivostomatitis (FGCS), as well as the SAA potential role as a prognostic marker in FGCS cases after surgical teeth extractions.

A sample of 20 cats was used: 10 animals diagnosed with FGCS (study group) and 10 cats with other dental diseases (control group), both without other diagnosed disorders.

SAA levels were determined in both groups and comparison was made between the values obtained. The study group SAA levels were also analyzed in two post-surgical moments (day 30 and day 60). The concentration of serum amyloid A was determined using an ELISA kit SAA-8.

Within the study group, all 10 cats presented with buccostomatitis and caudal stomatitis lesions, chronic inflammatory histological lesions and positive for Feline Calicivirus (FCV) infection.

Significantly higher SAA concentrations were observed in cats with FGCS ($3,9885 \pm 1,377 \mu\text{g/ml}$) relatively to healthy cats ($0,1146 \pm 0,193 \mu\text{g/ml}$) ($p = 0,000$), revealing that there is an underlying systemic inflammatory condition in individuals affected with FGCS. However, a decrease in SAA levels after the surgical treatment was only observed in 3 of the 10 cases. No correlations were found between clinical signs and lesion severity and SAA levels.

This study reveals that SAA is persistently increased in FGCS regardless of the surgical extractions. SAA may have a role as a poor prognostic marker in animals with FGCS.

Key words: feline chronic gingivostomatitis, serum amyloid A, cat, surgical teeth extractions, feline calicivirus, biomarker.

ÍNDICE GERAL

AGRADECIMENTOS	i
APOIOS FINANCEIROS.....	iii
RESUMO	v
ABSTRACT	vii
ÍNDICE GERAL	ix
ÍNDICE DE FIGURAS	xi
ÍNDICE DE TABELAS	xii
ÍNDICE DE GRÁFICOS	xiii
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	xiv
PARTE I – RELATÓRIO DE ESTÁGIO CURRICULAR	1
PARTE II – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
1. Inflamação oral.....	3
2. Gengivoestomatite crónica felina.....	3
2.1. Etiopatogenia	3
2.1.1. Influência do calicivírus felino.....	4
2.1.2. Influência do herpesvírus felino.....	5
2.1.3. Influência do vírus da leucemia felina (FeLV) e do vírus da imunodeficiência felina (FIV).....	5
2.1.4. Influência das bactérias.....	6
2.1.5. Influência de outras doenças dentárias.....	6
2.1.6. Influência do ambiente	7
2.1.7. Influência de reações de hipersensibilidade	8
2.2. Patogenia	8
2.3. Sinais clínicos.....	9
2.4. Caracterização histopatológica.....	10
2.5. Diagnóstico.....	11
2.6. Tratamento.....	12
2.6.1. Tratamento de primeira linha.....	13
2.6.2. Tratamento cirúrgico.....	13
2.6.3. Tratamento médico.....	15
2.6.3.1. Antibióticos.....	15
2.6.3.2. Glucocorticóides.....	15
2.6.3.3. Ciclosporina.....	16
2.6.3.4. Interferão ómega recombinante felino (rFeIFN- ω).....	16
2.6.3.5. Terapia celular.....	17
2.6.3.6. Tratamento com Laser.....	18
2.6.3.7. Vacina para Calicivirus Felino (FCV).....	18
3. A Resposta inflamatória.....	19
3.1. Proteínas de fase aguda.....	20
3.1.1. A utilidade clínica das proteínas de fase aguda.....	21
3.1.2. Proteína amilóide a sérica.....	22
3.1.2.1. Síntese.....	22
3.1.2.2. Funções da SAA.....	23
3.1.2.3. Doseamento da SAA.....	23
PARTE III – VARIAÇÃO DOS NÍVEIS DE PROTEÍNA SÉRICA AMILÓIDE A COMO MARCADOR INFLAMATÓRIO NA GENGIVOESTOMATITE CRÓNICA FELINA.....	25

1. Objetivos.....	25
2. Materiais e métodos.....	25
2.1. Amostra.....	25
2.1.1. Critérios de inclusão.....	25
2.1.2. Critérios de exclusão.....	26
2.2. Procedimentos.....	26
2.2.1. Questionário aos tutores.....	26
2.2.2. Procedimento anestésico.....	26
2.2.3. Exame estomatológico-dentário.....	26
2.2.4. Radiografias dentárias.....	27
2.2.5. Outros exames complementares de diagnóstico.....	27
2.2.6. Tratamento dentário.....	28
2.2.7. Recolha de amostras sanguíneas para doseamento de SAA.....	28
2.2.8. Classificação da resposta ao tratamento.....	29
2.2.9. Doseamento da SAA.....	29
2.2.10. Análise estatística.....	30
3. Resultados.....	31
3.1. Caracterização da amostra.....	31
3.2. Sinais clínicos.....	31
3.3. Radiografias dentárias.....	32
3.4. Pesquisa de Calicivirus felino.....	33
3.5. Análise histopatológica.....	33
3.6. Resposta ao tratamento.....	33
3.7. Resultados do doseamentos de SAA.....	34
3.7.1. Comparação de grupos.....	35
3.7.2. Relação entre a variação de SAA e a recuperação.....	36
4. Discussão.....	37
5. Conclusões.....	42
6. Limitações do estudo.....	43
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	44
ANEXOS.....	I
Anexo I.....	I
Anexo II.....	II
Anexo III.....	III
Anexo IV.....	IV
Anexo V.....	V
Anexo VI.....	VI
Anexo VII.....	VII
Anexo VIII.....	VIII
Anexo IX.....	X
Anexo X.....	XI

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 – Gato, macho, 2 anos de idade, com gengivoestomatite crónica. A fotografia ilustra a exuberante estomatite caudal, envolvendo os arcos glossopalatinos.....	10
Figura 2 – Radiografias dentárias ilustrativas de lesões de reabsorção dentária realizadas a um gato do grupo casos (imagem da esquerda) e a um gato do grupo controlo (imagem da direita).....	32

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 – Valores médios de absorvância (450nm) das concentrações padrão de SAA fornecidas no kit para construção de uma reta de calibração.....	30
Tabela 2- Estatística inferencial das classificações das avaliações visuais das lesões ao longo do estudo.....	32
Tabela 3 – Classificação da resposta ao tratamento cirúrgico.....	33
Tabela 4 – Concentração de SAA obtida nos gatos do grupo controlo.....	34
Tabela 5 – Concentrações de SAA obtidas nos gatos do grupo com GECF (pré e pós-extrações dentárias)	34
Tabela 6 – Relação entre a presença de lesões de reabsorção dentária (RD) e concentração de SAA no dia 0.....	35
Tabela 7 – Resultados da análise estatística inferencial dos níveis séricos de SAA nos dois grupos de estudo (grupo controlo e grupo casos).....	36
Tabela 8 – Correlação entre a média da concentração sérica de AGP nos diferentes períodos estudados e a média do grau das lesões encontradas.....	36
Tabela 9 – Valores médios de concentração de SAA no primeiro e último tempo estudado por grupos de EDT.....	37

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1 – Evolução das médias das classificações de apetite, nível de atividade, limpeza e higiene e conforto aos 0, 30 e 60 dias.....	31
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADN – Ácido Desoxirribonucleico
IC – Intervalo de Confiança
CAMV – Centro de Atendimento Médico-Veterinário
CO₂ – Dióxido de Carbono
COX-2 - Ciclo-oxigenase-2
CRP – Proteína C Reativa (do Inglês, “C Reactive Protein”)
DAMP - Padrão Molecular Associado a Lesões (do Inglês, “Damage-Associated Molecular Patterns”)
 σ – Desvio Padrão
EDT – Eficácia do Tratamento
ELISA - Ensaio de Imunoabsorção Enzimática (do Inglês, “Enzyme Linked Immunosorbent Assay”)
FCV – Calicivírus felino (do Inglês, “Feline Calicivirus”)
FeLV - Vírus da Leucemia Felina
FIV - Vírus da Imunodeficiência Felina
GECF – Gengivoestomatite Crônica Felina
HDL - Lipoproteína de Alta Densidade (do Inglês, “High Density Lipoprotein”)
HEV-FMV – Hospital Escolar Veterinário da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa
HVF - Herpesvírus Felino
IFN- γ – Interferão gama
IL – Interleucina
MSC – Células Tronco Mesenquimais (do Inglês, “Mesenchymal Stem Cells”)
p – Nível de significância
PAAF – Punção Aspirativa por Agulha Fina
PAMP - padrão molecular associado a agentes patogénicos (do Inglês, “Pathogen-Associated Molecular Patterns”)
PCR - Reação em Cadeia da Polimerase
PFA – Proteínas de fase aguda (do Inglês, “Acute Phase Protein”)
PIF - Peritonite Infeciosa Felina
PMNs - Polimorfonuclear Neutrófilos
PRR - Recetores de Reconhecimento de Padrões (do Inglês, “*Pattern-Recognition Receptors*”)
RD – Reabsorções Dentárias
rFeIFN- ω – Interferão ómega recombinante felino
RNAm – Ácido Ribonucleico mensageiro (do Inglês, “Messenger Ribonucleic Acid”)
 ρ – Coeficiente de correlação
SAA – Proteína Amiloide A Sérica (do Inglês, “Serum amyloid A”)
SDR – Sem raça definida
SPF – Animal livre de agentes patogénicos específicos (do Inglês, “Specific Germ Free”)
TNF- α – Fator de necrose tumoral alfa (do Inglês, “Tumor Necrosis Factor Alpha”)

PARTE I – RELATÓRIO DE ESTÁGIO CURRICULAR

O estágio curricular do Mestrado Integrado em Medicina Veterinária decorreu de 17 de setembro de 2018 a 29 de março de 2019 no Hospital Escolar Veterinário (HEV) da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa, sob orientação da Professora Doutora Lisa Mestrinho. Este estágio teve a duração total de cerca de 1200 horas. Ao longo destes sete meses foram efetuadas rotações entre os diversos serviços do HEV-FMV.

O HEV-FMV é um hospital de referência e de 1ª opinião, com uma vasta casuística e casos referenciados de várias partes do país. Possui diversos serviços disponíveis, desde primeiras consultas, referências de outros Centros de Atendimento Médico-Veterinários (CAMVs) e segundas opiniões. Possui vários serviços como Imagiologia (dividindo-se em radiografia, tomografia computadorizada, endoscopia e ecografia); Medicina Geral; Medicina Interna (recebendo apenas consultas de referência de outros CAMVs); Oncologia; Oftalmologia (consultas e cirurgias); Dermatologia; e Cirurgia (realizando cirurgias eletivas, de urgência e de referência, nomeadamente neurocirurgia, cirurgias ortopédicas, de tecidos moles e cirurgias orais).

Foram realizadas diversas atividades aquando das rotações clínicas no HEV-FMV:

- Medicina Geral (8 semanas): recolha de história clínica dos doentes, realização de exames de estado geral, discussão dos achados clínicos obtidos e eventuais análises ou outros exames de diagnóstico com o Médico Veterinário responsável previamente à entrada do mesmo na consulta, com o intuito de concluir possíveis diagnósticos diferenciais e planeamento da terapêutica necessária para cada doente;
- Cirurgia (8 semanas): realização de procedimentos pré-cirúrgicos como colocação de cateter venoso, administração de pré-medicação, tricotomia, assépsia do campo operatório, indução anestésica e entubação endotraqueal, participação como ajudante de cirurgião e circulante em diversas cirurgias, monitorização da indução anestésica, da anestesia e do recobro anestésico.
- Imagiologia (3 semanas): participação em exames imagiológicos como:
 - radiografias e tomografias computadorizadas, aprendizagem do posicionamento correto para as projeções solicitadas e interpretação dos exames,
 - participação em mielografias, bem como colaboração na realização de relatórios dos respetivos exames;

- Ecografia (2 semanas): participação em exames ecográficos, punções aspirativas de agulha fina (PAAFs) ecoguiadas e biópsias ecoguiadas.
- Medicina Interna (2 semanas): participação em consultas de um Médico Diplomado pelo Colégio Europeu, elaboração de relatórios de todas as consultas realizadas em conjunto com o Médico responsável, participação em endoscopias digestivas altas e baixas, rinoscopias e broncoscopias;
- Oncologia (2 semanas): participação em sessões de quimioterapia, primeiras consultas e consultas de seguimento, aprendizagem da correta manipulação de agentes quimioterápicos;
- Dermatologia (2 semanas): participação em consultas de referência, realização de procedimentos de diagnóstico tais como citologias por aposição, citologias por fita-cola, raspagens superficiais e profundas, citologias auriculares e respetivas colorações, tricotomias, biópsias excisionais por punch, visualização de vídeo-otoscopias;
- Oftalmologia (2 semanas): participação em consultas de primeira opinião e de referência, bem como em cirurgias oftalmológicas como cirurgia de cataratas, ecografias oculares e eletrorretinografias;
- Internamento diurno: monitorização de todos os animais internados, preparação e administração da medicação nos horários necessários, alimentação e passeio dos animais ambulatoriais e participação na discussão clínica dos casos internados e respetivos plano diagnóstico e terapêutica a preconizar;
- Internamento noturno: para além das atividades acima referidas, triagem e receção de doentes em regime de urgência;
- Unidade de Isolamento de Doenças Infeciosas (1 semana): aquisição de competências no manuseio de animais com doenças infecciosas, minimizando o risco de exposição e disseminação das mesmas.

Durante este período foi também possível acompanhar a Professora Lisa Mestrinho em inúmeros casos de estomatologia e cirurgia oral. Houve a possibilidade de realizar e participar no posicionamento específico dos animais para a realização de radiografias intraorais e sua interpretação assim como realizar procedimentos de destarização e polimento dentário e ainda efetuar suturas de encerramentos cirúrgico.

PARTE II – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1. Inflamação oral

As afeções inflamatórias da cavidade oral podem ser divididas segundo a sua causa subjacente em: inflamação secundária a processos locais como doença dentária, queimaduras (químicas, elétricas ou térmicas) e reações a corpos estranhos ou processos sistémicos com manifestação oral, como doenças auto-imunes, doenças infecciosas e reações de hipersensibilidade. Existem ainda afeções diversas como o complexo granuloma eosinofílico felino, a úlcera indolente felina e a gengivoestomatite crónica felina (GECF) (Bonello, 2007).

A GECF pode ser considerada uma síndrome caracterizada por uma inflamação persistente, frequentemente grave, da mucosa oral (Healey et al., 2007).

2. Gengivoestomatite Crónica Felina

A gengivoestomatite crónica felina (GECF) é uma afeção que se destaca pela complexidade e gravidade, mais do que pela sua prevalência. De facto, um estudo de prevalência da doença da GECF em consulta de primeira opinião reflete uma prevalência de cerca de 0,7%, o que é, claramente, inferior à prevalência de outras doenças dentárias tais como a lesão de reabsorção dentária e a doença periodontal (Healey et al., 2007).

Esta doença caracteriza-se por uma intensa inflamação oral que ultrapassa a junção mucogengival e se estende à mucosa oral e pela presença de lesões de carácter ulcerativo ou ulcero-proliferativo que podem chegar a abranger a região dos arcos glossopalatinos (Hennet, Camy, McGahie & Albouy, 2011; Cannon, 2015). A presença de estomatite caudal diferencia a GECF de outras doenças inflamatórias da cavidade oral (Farcas, Lommer, Kass & Verstraete, 2014).

2.1. Etiopatogenia

A etiologia da GECF permanece desconhecida, no entanto, aceita-se a hipótese de que é multifatorial e que resulta de uma resposta imunitária aberrante do hospedeiro face a um estímulo antigénico crónico com origens variadas (Johnston, 2012; Druet & Hennet, 2017). Vários agentes infecciosos parecem estar envolvidos na etiologia da GECF, nomeadamente antigénios virais, como o Calicivirus Felino (FCV), o vírus da Imunodeficiência Felina (FIV), o vírus da Leucemia Felina (FeLV) e o Herpesvirus Felino (HVF), e antigénios bacterianos como bactérias como *Bartonella henselae*, *Pasteurella multocida* e outras ainda por identificar (Quimby et al., 2008; Lommer, 2013b). Os fatores não infecciosos que se pensa terem influência nesta síndrome são a

presença de outras doenças dentárias, o stresse ambiental e as reações de hipersensibilidade (Johnston, 2012).

2.1.1. Influência do calicivírus felino

O calicivírus felino (FCV) é um agente patogénico da cavidade oral e do aparelho respiratório superior que causa quadros de conjuntivite, rinite e vesiculação e ulceração do epitélio oral, incluindo da língua (Maclachlan & Dubovi, 2017)

Muitos dos animais infetados pelo FCV não demonstram sinais clínicos, no entanto, os sinais clínicos mais frequentemente observados são febre e úlceras linguais ou orais. (Pesavento, Chang & Parker, 2008).

Vários estudos demonstraram que o FCV consegue ser isolado da boca de gatos que sofrem de GECF mais frequentemente do que de bocas de animais saudáveis (Thomson et al, 1984; Knowles et al., 1989; Dowers et al., 2010; Fernandez et al., 2017; Nakanishi et al., 2018). Nos anos 80 foram publicados estudos em que o FCV foi identificado através de isolamento viral ou por deteção de anticorpos em mais de 70% dos gatos afetados por GECF (Thomson et al, 1984; Knowles et al., 1989), enquanto estudos mais recentes demonstraram prevalências de 54% (Belgard et al, 2010), 40,5% (Dowers et al., 2010) e 58% (Fernandez, Manzanilla, Lloret, León & Thibault, 2017) de gatos com GECF positivos a FCV detetado por *polymerase chain reaction* (PCR).

Esta incidência elevada em gatos afetados por GECF comparando com os gatos saudáveis sugere que o FCV tem, de facto, um papel na promoção da inflamação oral e são vários os estudos que suportam este envolvimento (Lommer & Verstrate, 2003; Dowers et al., 2010; Fernandez et al., 2017; Nakanishi et al., 2018). No entanto, apesar de quadros agudos de mucosite oral conseguirem ser induzidos experimentalmente ao infetar gatos com diferentes estirpes de FCV provenientes de gatos com GECF, os quadros crónicos nunca conseguiram ser reproduzidos (Knowles et al., 1991; Reubel et al., 1992). Recentemente, Rolim e os seus colaboradores (2016), não detetaram antígenos FCV em nenhum dos animais com GECF, quer por PCR, quer por protocolos de imunohistoquímica das lesões orais dos mesmos. No entanto, detetaram antígenos FIV ou FeLV nas amostras de biópsias orais de gatos com GECF. Em 2017, Druet e Hennet, demonstraram que a gravidade das lesões de 104 gatos com GECF e o efeito das extrações dentárias não estão relacionados com a carga viral de FCV. Paralelamente, a carga viral e a

gravidade das lesões não exibiram correlação com o tempo necessário para serem observadas melhorias clínicas.

Quadros de GEFC não estão relacionados com biótipos específicos de FCV (Poulet et al., 2000) por isso pensa-se que o desenvolvimento de GEFC pode estar associado à resposta imunitária do hospedeiro à infecção crónica pelo vírus, ao invés do desenvolvimento de uma estirpe de FCV particularmente virulenta (Southerden & Gorrel, 2007). Assim, apesar do evidente papel que o FCV desempenha na etiopatogenia da GEFC, não se pode confirmar uma relação causal direta e outros fatores devem estar implicados.

2.1.2. Influência do herpesvírus felino

O herpesvírus felino (HVF) é um dos agentes etiológicos da rinotraqueíte viral felina mas está também associado a outras síndromes clínicas, como conjuntivite e queratite crónicas, faringite, glossite e palatite ulcerativa, dermatite facial, aborto e mortalidade neonatal (Lommer & Verstraete, 2003).

Apesar de muito referida a sua relação com a GEFC, são muitos os estudos em que não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre grupos de gatos com e sem GEFC para o HVF (Harbour et al., 1991; Quimby et al., 2008; Zicola et al., 2009; Dowers et al., 2010; Nakanishi et al., 2018). Todavia Lommer & Verstraete (2003) e Fernandez (2016) obtiveram prevalências superiores de HVF em gatos com GEFC quando comparados com o grupo controlo. No entanto, no primeiro estudo, todos os gatos com GEFC eram positivos para HVF e FCV, não tendo sido detetados gatos doentes negativos para ambos os vírus. Fernandez et al. (2016) detetaram, efetivamente, uma maior prevalência de gatos positivos para o HVF no grupo de gatos com GEFC (15,6%) quando comparando com o grupo controlo, porém, esta prevalência de HVF foi ainda superior nos grupos de gatos com doença respiratória (28,3%) e conjuntivite (24,2%).

2.1.3. Influência do vírus da leucemia felina (FeLV) e do vírus da imunodeficiência felina (FIV)

Ambos estes retrovírus já foram apontados como tendo influência na etiopatogenia da GEFC. Pensa-se que a contribuição destes vírus para a doença seja de forma indireta ao provocarem imunossupressão sistémica, e assim conduzem a uma resposta imunitária errática a antígenos orais (Kornya et al. 2014). Enquanto Kornya et al. (2014), associaram a presença de doença oral com a infecção por retrovírus, Quimby et al. (2008) não encontraram associação direta entre estes

agentes e a GECF. Mais recentemente, Rolim et al. (2016), identificaram o FeLV como o agente infeccioso mais prevalente nas amostras de gatos com GECF analisadas. Deste modo, sobressai a importância de testar os animais com GECF para estes vírus.

2.1.4. Influência das bactérias

Apesar de se acreditar que certas bactérias desempenham um papel importante na GECF, poucos estudos procuraram investigar esta relação. Dois estudos sugerem que infecções bacterianas oportunistas possam estar envolvidas na GECF (Sims, Moncla & Page, 1989; Dolieslager et al., 2011). Sabe-se que a microbiota bacteriana oral de gatos com GECF é menos diversa que a microbiota de gatos saudáveis (Sims et al., 1989; Dolieslager et al., 2011). Dolieslager et al. (2011) encontraram uma maior prevalência da bactéria *Pasteurella multocida subsp. multocida* nos gatos doentes, levantando a hipótese de este ser um agente importante na etiologia da doença. Em 2013, Dolieslager et al., estabeleceram uma associação entre a gravidade do quadro clínico da GECF e a presença de alguns agentes, nomeadamente *Tannerella forsythia*. Em 2016, Fernandez et al., detetaram uma prevalência 37,7% de *Mycoplasma felis* em gatos afetados por GECF. Porém, animais com outras doenças, como doença do trato respiratório superior ou conjuntivite, apresentaram prevalências superiores deste agente. A bactéria *Bartonella henselae* também já foi indicada como sendo um agente etiológico da GECF, no entanto, apenas dois estudos serológicos de pequena dimensão estabeleceram uma relação entre este agente e a doença (Ueno et al., 1996; Glaus, Greene, Glaus & Wolfensberger, 1997). Estudos posteriores não demonstraram associação entre a presença de *Bartonella* e GECF (Dowers & Lappin, 2005; Quimby et al., 2008; Belgard et al., 2010; Dowers et al., 2010). Estes dados merecem uma investigação mais aprofundada de modo a definir com maior precisão os potenciais papéis que estes organismos possam ter no desenvolvimento da GECF.

2.1.5. Influência de outras doenças dentárias

As doenças como a periodontite e a reabsorção dentária podem existir sem que haja GECF (Diehl & Rosychuk, 1993; Niemiec, 2008). Contudo, a presença concomitante destas doenças com GECF tem sido sugerida como tendo um efeito exacerbante nesta síndrome (Hennet et al., 2011; Johnston, 2012; Lommer, 2013b). Já foi afirmado que apenas gatos gravemente afetados por GECF apresentam doença periodontal, enquanto a maioria não exibe qualquer doença dentária (Diehl & Rosychuk, 1993). No entanto, estudos posteriores relataram a presença de periodontite,

lesões de reabsorção dentária (LRD) e raízes retidas simultaneamente com GECF (Bellei, Dalla, Masetti, Pisoni & Joechler, 2008; Farcas, Lommer, Kass & Verstraete, 2014). Sabe-se que a reabsorção dentária do tipo I fragiliza a estrutura dentária, predispondo a fraturas dentárias e à presença de raízes retidas que, por sua vez, contribuem para a persistência da inflamação oral local (Lommer & Verstraete, 2003; Lyon, 2005; Bellei et al., 2008) . Um estudo retrospectivo em 101 gatos com GECF conduzido por Farcas et al. (2014) demonstrou que a GECF está associada a quadros mais graves e difusos de periodontite, acompanhados de uma maior prevalência de reabsorção dentária e presença de raízes retidas, que outras doenças da cavidade oral. Assim, realça a importância da realização de radiografias de toda a cavidade oral em animais com GECF de modo a diagnosticar a extensão da periodontite associada, a existência de dentes com lesões de reabsorção dentária e a identificação de raízes retidas, de modo a planejar a melhor abordagem terapêutica (Farcas et al, 2014).

2.1.6. Influência do ambiente

O ambiente pode desempenhar um papel importante na medida em que gatos que vivem em colônias ou em casas em que convivam vários gatos parecem ser afetados mais precocemente pela GECF, provavelmente devido à maior proximidade entre animais e níveis elevados de stresse, que propiciam a transmissão de agentes infecciosos (Dowers et al., 2010; Dolieslager et al., 2011; Jennings, Lewis, Soltero-Rivera, Brown & Reiter, 2015; Peralta & Carney, 2019). Vários estudos já descreveram muitos casos de animais com GECF que habitavam em conjunto com outros gatos (Dowers et al., 2010; Jennings et al., 2015). Um estudo recente de Peralta & Carney (2019) demonstrou que a GECF é mais prevalente em ambientes em que existem mais que um gato e que o risco se correlaciona com o número de gatos coabitantes. Paralelamente, já foram relatadas prevalências superiores de FCV, FeLV e FHV em ambientes em que convivam vários gatos (Lutz et al., 2009; Radford et al., 2009; Thiry et al., 2009; Möstl et al., 2013). No estudo de Peralta & Carney (2019), a prevalência de gatos infectados por FCV revelou-se proporcional ao número de gatos coabitantes. Estes resultados mostram uma possível implicação destes agentes patogénicos na patogenia da GECF e reforçam a relação entre ambientes com muitos animais e a transmissão de agentes infecciosos.

2.1.7. Influência de reações de hipersensibilidade

Pensa-se que a hipersensibilidade a antígenos da placa bacteriana ou até mesmo alérgenos alimentares pode também estar implicada na etiologia e na progressão da GECF (Williams & Aller, 1991; Diehl & Rosychuk, 1993; Johnston, 2012). Com efeito, certos componentes das dietas, tais como as proteínas são apontados como fontes de antígenos (Rochette, 2001). Em Medicina Humana, já foram associados casos de estomatite ao consumo de certos aditivos alimentares ou a deficiências em determinados micronutrientes (Wray, Rees, Gibson & Forsyth, 2000). Segundo esta perspectiva, o diagnóstico poderia ser feito com base na resposta a um regime estrito de dieta hipoalérgica (Diehl & Rosychuk, 1993).

2.2. Patogenia

A patogenia da GECF ainda não é conhecida. Acredita-se que a resposta imunitária do hospedeiro à estimulação antigénica contínua e os efeitos diretos dos produtos dos microrganismos da placa dentária originam a extensa inflamação da gengiva característica desta doença (Harley et al., 1999; Dolieslager et al., 2013).

Em termos histológicos, as lesões de GECF são caracterizadas por um infiltrado de células capazes de ativar respostas imunitárias nos tecidos orais. Este infiltrado celular é constituído por plasmócitos, responsáveis pela produção de imunoglobulinas (Igs) que estão associadas a processos de hipersensibilidade imediata e doenças do sistema imunitário; linfócitos T e B, responsáveis pela imunidade celular e pelas reações mediadas por anticorpos, respetivamente; mastócitos; polimorfonucleares neutrófilos (PMNs) e macrófagos (Lyon, 2005; Rolim et al., 2017). Arzi et al. (2010) observaram números elevados de mastócitos na gengiva de gatos com GECF, doença periodontal e reabsorção dentária. Estas células podem influenciar a resposta imunitária através da libertação de mediadores como citocinas, aminas vasoativas e enzimas após estimulação (Walsh, 2003). Assim, é sugerido que os mastócitos desempenhem um papel na iniciação e perpetuação da resposta inflamatória local e imunitária na GECF (Arzi et al., 2010; Harley, Gruffydd-Jones, & Day, 2011; Rolim et al., 2017). Este infiltrado celular inflamatório e a presença de hipergamaglobulinémia podem indicar a persistência de estimulação antigénica e uma resposta imunitária mediada por células ou humoral (Bonello, 2007).

Vários estudos descreveram níveis séricos e salivares elevados de imunoglobulinas (IgG e IgM) em casos de GECF (White et al., 1992; Harley, Gruffydd-Jones & Day, 2003). Concomitantemente, observam-se menores concentrações salivares de IgA em gatos com GECF

quando comparados com gatos saudáveis e já foi descrito que uma diminuição nos níveis salivares de IgA contribui para a ocorrência de afeções orais (Niza, Mestrinho & Vilela, 2004). Tanto Harley et al. (1999) como Dolieslager et al. (2013) demonstraram que os gatos com GECF apresentavam, respetivamente, níveis superiores de citocinas (interleucina-2 (IL-2), IL-4, IL-6, IL-10 e interferão gama (IFN- γ) no estudo de Harley et al. (1999) e fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), IFN- γ , IL-1 β , IL-4, IL-6 e IL-10 no estudo de Dolieslager et al. (2013), quando comparados com gatos saudáveis. Os resultados destes estudos demonstraram que o padrão de expressão de citocinas (Th) da mucosa oral felina, que normalmente é do tipo 1, altera-se no caso da GECF, passando de uma resposta do tipo 1 (Th1) para uma resposta mista entre Th1 e Th2. No estudo de Harley et al. (2011) a extensão da expressão de moléculas do MHC II nos tecidos da mucosa oral correlacionaram-se com a gravidade da inflamação, sugerindo que a este nível existem altos níveis de apresentação de antígenos, contribuindo para a indução e persistência da resposta inflamatória local. Pensa-se que pode ocorrer a formação de complexos antígeno-anticorpo nos tecidos com a libertação do complemento, aumentando a inflamação local (Bonello, 2007). A exposição contínua a antígenos, como os presentes na placa dentária, resultam em reações persistentes que podem justificar a gravidade das lesões observadas (Bonello, 2007). As lesões típicas de GECF representam um processo inflamatório crónico que afeta a mucosa e, frequentemente, a submucosa. Estas lesões traduzem uma mistura complexa de respostas imunitárias inatas, humorais e mediadas por células (Harley et al., 2011). Todos estes achados são fortemente indicativos de que uma alteração na resposta imunitária do animal esteja na base da patogenia da GECF.

2.3. Sinais clínicos

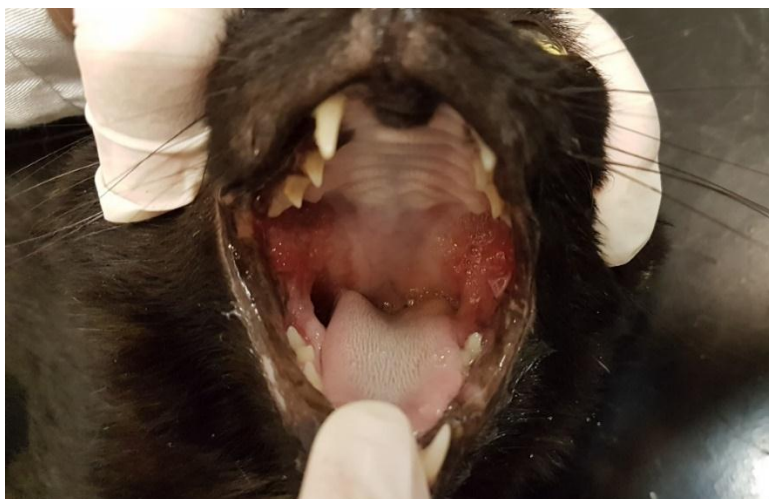
Os sinais clínicos da GECF dependem da gravidade, da localização das lesões e do próprio indivíduo. Os gatos podem não apresentar sinais clínicos, demonstrando apenas relutância ao abrir a boca ao exame físico, ou exibirem quadros de intensa dor oral. Nos gatos com sinais clínicos, estes usualmente incluem inapetência, disfagia, anorexia, halitose, ptialismo, por vezes tingido de sangue, desconforto oral ou mesmo dor, perda de peso e desidratação (Jennings et al., 2015; Santos et al., 2016). O quadro clínico pode também incluir vocalização e alterações comportamentais, como agressividade, irritabilidade, depressão, alterações na preferência de alimento seco para alimento húmido, diminuição do “*grooming*” levando a um pior aspeto do pelo, e comportamentos como colocarem as patas na boca e aversão ao toque nesta zona

(Southerden & Gorrel, 2007; Dolieslager et al., 2011). A qualidade de vida destes animais pode estar tão comprometida ao ponto de levar os tutores a optarem pela eutanásia (Winer, Arzi & Verstraete, 2016).

Os gatos com GECF apresentam um grau de inflamação da mucosa oral desproporcionalmente elevado quando comparado com a acumulação de cálculo dentário e com a presença de doença dentária visível (Healey et. al., 2007).

Ao exame físico, na maioria dos animais, é possível observar uma exuberante inflamação difusa da mucosa oral, normalmente bilateral, de aspeto ulceroproliferativo que se pode estender até aos arcos glossopalatinos, como pode ser observada na Figura 1. Alguns animais apresentam um padrão um pouco diferente, exibindo lesões multifocais e coalescentes. Pensa-se que esta apresentação corresponda a uma manifestação precoce da GECF que depois evolui para o padrão mais difuso descrito previamente. A presença de úlceras linguais e lesões no palato mole e duro também já foi observada em animais com GECF. Pode também ser detetada linfadenomegália mandibular (Lyon, 2005; Rolim et al., 2017).

Figura 1- Fotografia de um gato com gengivoestomatite crónica. A imagem ilustra a exuberante estomatite caudal, envolvendo os arcos glossopalatinos (Original).



2.4. Caracterização histopatológica

Em termos histopatológicos, as lesões orais provocadas pela GECF caracterizam-se por um infiltrado denso e difuso composto maioritariamente por plasmócitos e linfócitos e, em menor número por neutrófilos, macrófagos e mastócitos, na mucosa e submucosa. Esta composição é a razão pela qual esta doença também é conhecida por gengivoestomatite linfoplasmocítica felina

(Diehl & Rosychuk, 1993; Harley, Helps, Harbour, Day & Al, 1999; Lyon, 2005; Winer et al., 2016; Rolim et al., 2017). Muitas lesões de GECF apresentam também ulceração do epitélio e, nesse caso, estão normalmente associadas a um maior infiltrado neutrofílico (Rolim et al., 2017). Em 2011, Harley e os seus colaboradores, verificaram que existe uma correlação entre a gravidade da inflamação da mucosa ao exame clínico e a gravidade das lesões microscópicas. Ou seja, a população celular que constitui o infiltrado altera-se com a gravidade do quadro inflamatório da GECF, aumentando o número de células CD79a+ (maioritariamente plasmócitos), células L1+ (maioritariamente neutrófilos), células T CD3+ e o nível de expressão de MHC classe II. Geralmente, as células T CD8+ predominam sobre as células T CD4+ sugerindo a existência da indução de uma resposta imunitária citotóxica mediada por células, o que pode ser consistente com uma etiologia viral, como já foi referido anteriormente. A análise histopatológica e imunohistoquímica de lesões de GECF representa um processo inflamatório destrutivo e crónico que afeta os tecidos da mucosa e, frequentemente, também da submucosa (Harley et al., 2011).

2.5. Diagnóstico

Para se estabelecer um diagnóstico de GECF é crucial que seja feita uma anamnese minuciosa com ênfase em questões relacionadas com a dieta, idade de início dos sinais clínicos e evolução do processo, modo de vida do animal, presença de outras doenças sistémicas e vacinação (Lyon, 2005). O exame clínico é de extrema importância e, na maioria dos casos, a cavidade oral só se torna passível de ser inspecionada com recurso a tranquilização ou anestesia geral. De modo a tornar o exame clínico mais sistemático, recomenda-se a utilização de uma ficha clínica dentária para o registo de todas as alterações encontradas. De seguida deve-se complementar o diagnóstico com análises hematológicas e bioquímicas de modo a identificar a presença de afeções sistémicas subjacentes. Nestes exames deve estar incluído o proteinograma dado que em cerca de metade dos animais com GECF existe hiperproteinémia, devido à hipergamaglobulinémia (Harley et al., 1999; Johnston, 2012). É importante também pesquisar a presença de infeção viral por parte dos agentes virais que têm sido envolvidos nesta doença através de análises serológicas e virológicas. A pesquisa de FCV pode ser feita através da análise de amostras colhidas por zaragatoa oronasal e o FIV e o FeLV devem ser pesquisados via análise serológica (Niza et al., 2004; Santos et al., 2016). A pesquisa de agentes bacterianos tem pouca relevância, dada sua magnitude na cavidade oral (Hennet, 1997; Harley, 2003).

O diagnóstico, muitas das vezes, consegue ser estabelecido apenas com a observação das lesões e sinais clínicos (Winer et al., 2016). No entanto, a biópsia das áreas afetadas é o único exame que por si só permite estabelecer um diagnóstico definitivo. A análise histopatológica é especialmente necessária para excluir outros diagnósticos como neoplasias, granuloma eosinofílico, afeções auto-imunes, queimaduras por agentes cáusticos ou processos infecciosos. O exame radiográfico intra-oral, apesar de não ser essencial para o diagnóstico de GECF, é fundamental para avaliar a integridade do periodonto e osso e para localizar processos de reabsorção dentária, que muitas vezes acompanham situações de GECF, e eventuais raízes dentárias retidas (Niza et al., 2004; Johnston, 2012; Niemiec, 2012). Sabendo-se que as células T CD8+ predominam sobre as células T CD4+ em animais com GECF, a realização da determinação do rácio de células CD4+/CD8+ ou perfil de citocinas pode ser uma ferramenta a utilizar no futuro, uma vez que as células CD8+ podem ser utilizadas como biomarcadores para a seleção de animais a serem submetidos a terapia celular (Arzi et al., 2016).

2.6. Tratamento

Tal como a etiologia da GECF ainda está por determinar, ainda não existe um tratamento consistentemente eficaz. A reposição do equilíbrio entre a resposta imunitária do animal e a estimulação antigénica oral é tida como o objetivo principal na terapêutica da GECF. Portanto, as várias opções terapêuticas têm sempre como objetivo suprimir a inflamação instalada. No entanto, sendo esta uma doença tão difícil de tratar, muitas vezes uma redução da inflamação para níveis toleráveis já se considera um resultado satisfatório (Squarizoni, Bani, Cialdai & Monici, 2017). Nas últimas décadas têm surgido muitas opções terapêuticas, normalmente categorizadas como médicas ou cirúrgicas, sendo que o pilar do tratamento médico passa pela imunossupressão enquanto o tratamento cirúrgico envolve a extração dos dentes pré-molares e molares ou a totalidade da dentição de modo a eliminar a resposta antigénica crónica. No entanto, todas estas opções possuem efeitos adversos, que incluem desde poliúria, polidipsia, diabetes mellitus secundária, fragilidade cutânea, diminuição da resposta terapêutica com o tempo (tratamento médico com corticosteroides), a dor pós-operatória, menor função e custos elevados (tratamento cirúrgico) (Winer et al., 2016). A variabilidade da resposta aos tratamentos é elevada e normalmente incompleta, provisória ou de duração incerta. É, então, de extrema importância que o tutor do animal seja informado do carácter crónico desta afeção e do desafio terapêutico que representa. Tendo em conta os sintomas do animal, as diferentes opções terapêuticas devem ser

discutidas com o tutor, de modo a se estabelecer uma abordagem individualizada (Niza et al., 2004).

2.6.1. Tratamento de primeira linha

O primeiro passo no tratamento de qualquer gato com GECF passa pela profilaxia dentária e procedimentos de higiene realizados em casa com o objetivo de reduzir a placa bacteriana existente (Johnston, 2012). Estas medidas devem ser aplicadas antes de qualquer outra terapêutica e aquando dos primeiros sinais clínicos. O controlo desta doença pode ser iniciado em casa, envolvendo escovagem dentária regular, uso de antissépticos orais como clorhexidina e eventualmente géis antibacterianos à base de doxiciclina ou de ascorbato de zinco (Niza et al., 2004; Bonello, 2007; Southerden, 2010; Bellows, Carithers & Gross, 2012; Milella, Beckman & Kane, 2014). Devem também ser utilizadas dietas que minimizem a formação de cálculo dentário e que sejam hipoalergénicas (Niza et al., 2004). Este regime deve ser continuado ao longo da vida do animal mas muitas vezes, quando a manutenção em casa é difícil de realizar, é necessário recorrer ao tratamento periodontal profissional. Estas limpezas podem ser tão frequentes como 3 a 4 vezes por ano (Southerden, 2010; Johnston, 2012). Este procedimento é realizado sob anestesia geral e inclui destartarização supragengival, curetagem subgengival, aplanamento radicular, e polimento (Williams & Aller, 1992; Southerden, 2010). No entanto, a manutenção em casa tem que continuar a ser realizada e este plano terapêutico acaba por ser rejeitado porque a maioria dos pacientes sente dor aquando dos procedimentos de higiene devido à inflamação generalizada (Squarzone et al., 2017). Assim, muitas vezes esta abordagem revela-se insuficiente e é necessário avançar com novas estratégias, nomeadamente as opções cirúrgicas ou médicas.

2.6.2. Tratamento cirúrgico

Tanto as últimas publicações de revisão como os especialistas na área da estomatologia estabelecem a extração eletiva dos dentes como a opção a tomar, caso o tratamento de primeira linha por si só seja insuficiente para reduzir a carga antigénica oral e controlar a inflamação (Bellei, Dalla, Masetti, Pisoni & Joechler, 2008; Jennings et al., 2015; Winner et al., 2016). A justificação para as extrações dentárias prende-se com o facto de os dentes serem superfícies retentoras de placa bacteriana, potenciando o desenvolvimento da doença (Cannon, 2015). A eleição do tratamento cirúrgico, numa fase precoce, justifica-se com o facto de a GECF ser frequentemente refratária ao tratamento médico (Harley, Helps, Harbour, Gruffydd-Jones & Day,

1999), sendo que nenhuma opção médica se mostra superior às outras (Harley et al., 2003). Geralmente, a abordagem cirúrgica consiste na extração de todos os dentes pré-molares e molares (Hennet, 1997), no entanto, em casos de inflamação que se estende até aos dentes caninos e incisivos, alguns autores recomendam extrações dentárias totais (Squarzoni et al., 2017). Porém, segundo o estudo retrospectivo realizado por Jennings (2015), a extensão das extrações dentárias (extração parcial ou extração total) não se relaciona com a resposta geral ao tratamento e o autor recomenda extrações dentárias parciais. O termo extrações dentárias parciais define a extração de: dentes em zonas com lesões inflamatórias, dentes com periodontite grave e dentes com lesões de reabsorção.

Tanto Hennet em 1997 como Bellei em 2008 concluíram nos seus estudos que aproximadamente 60% dos gatos submetidos a extrações dentárias obtiveram uma resolução completa da doença apenas com esta remoção. Aproximadamente 20% dos gatos permaneceram com alguma inflamação oral mas os sinais clínicos relatados anteriormente desapareceram ou melhoraram. Os restantes 20% precisaram de tratamento médico contínuo. O sucesso do tratamento cirúrgico aparenta ser menor nos casos em que existe inflamação grave na mucosa orofaríngea (Mihaljevic, 2003).

O manejo da dor é fundamental independentemente da abordagem terapêutica escolhida. Para este efeito são utilizados anti-inflamatórios não esteroides – meloxicam, carprofeno ou cetoprofeno - e/ou opiáceos, como o fentanilo ou a buprenorfina. A buprenorfina (agonista parcial dos recetores μ) pode ser administrada oralmente pelos donos em casa até 5 dias após a cirurgia (Niza et al., 2004; Steagall, Monteiro-Steagall & Taylor, 2014). Em caso de hospitalização, pode-se recorrer às alternativas injetáveis ou a um adesivo de absorção transcutânea de fentanilo. Após a intervenção cirúrgica é importante que o animal mantenha o seu aporte nutricional e a utilização de uma dieta húmida é essencial. Nalguns casos o uso de uma dieta de convalescença pode ser necessário (Johnston, 2012). Em casos graves pode ter que se recorrer à colocação de um tubo de esofagostomia para alimentação assistida. Assim que a inflamação e a dor estejam controladas, é importante que os tutores realizem procedimentos de higiene oral ao animal, como o uso de géis antissépticos à base de clorhexidina preferencialmente associados à escovagem dentária (Southerden, 2010; Milella, Beckman & Kane, 2014).

2.6.3. Tratamento médico

O tratamento médico é usado muitas vezes associado ao tratamento cirúrgico, sobretudo em casos refratários (Lommer, 2013b). Cerca de 26% dos animais necessitam de tratamento de suporte após as extrações dentárias (Jennings et al., 2015). Os fármacos mais utilizados para este efeito são os antibióticos, os glucocorticoides, a ciclosporina e o interferão ómega recombinante felino (rFeIFN- ω).

2.6.3.1. Antibióticos

A antibioterapia tem maior interesse se começada pré-cirurgicamente, de modo a melhorar os tecidos moles e a prevenir a ocorrência de infeções oportunistas. É importante que o antibiótico escolhido tenha um bom espectro de ação sobre bactérias aeróbicas e anaeróbicas e boa penetração no osso (Dolieslager et al., 2011) e, deste modo, os mais utilizados são a clindamicina, a amoxicilina, a associação de amoxicilina com ácido clavulânico e o metronidazol (Johnston, 2012). No entanto, a resolução dos sinais clínicos é transitória (Niza et al., 2004), sendo necessário a adição de outros fármacos para o controlo da doença.

2.6.3.2. Glucocorticoides

Os glucocorticoides são muitas vezes utilizados em casos de GECF refratária ao tratamento cirúrgico, porém, a sua utilização é controversa. O seu interesse prende-se com as suas propriedades anti-inflamatórias, potenciando o efeito dos analgésicos, e efeito estimulador do apetite (Hennet et al., 2011; Reiter & Soltero-Rivera, 2017). Os glucocorticoides são absorvidos para o interior das células devido às suas propriedades lipofílicas. No citosol combinam-se com recetores formando complexos que são de seguida transportados para o núcleo celular onde se ligam a regiões específicas de ADN, ativando e inibindo a transcrição de vários genes. Dentro dos quais é estimulada a síntese de I κ B α , que é um fator inibidor do NF- κ B. O NF- κ B é responsável pela síntese de citocinas e pela resposta das células T. Deste modo, os corticoesteróides suprimem tanto os processos inflamatórios como imunológicos (Tizard, 2013). Sabe-se também que estas moléculas afetam diretamente o centro regulador do apetite, inibindo a produção do fator libertador de corticotrofina (CRF) e potenciando uma maior ingestão alimentar estimulada pela noradrenalina (Tataranni et al., 1996; Hirschberg, 1998).

No entanto, devido ao provável envolvimento de vários vírus na doença, a sua administração pode propiciar o curso da infeção ao diminuir a resposta do hospedeiro ao estímulo antigénico

(Niza et al., 2004). O fármaco mais utilizado é a prednisolona em doses que variam desde anti-inflamatórias a imunossupressoras, sendo depois reduzida progressivamente (Hennet et al., 2011). No entanto, a melhoria dos sinais clínicos não é duradoura e são inúmeros os efeitos secundários nefastos que se podem desenvolver com a toma prolongada de glucocorticóides, como: poliúria, polidipsia e a possibilidade de desenvolvimento de diabetes mellitus (Squarizoni, 2017). Por estas razões, a utilização destes fármacos como tratamento imunossupressivo deve ser bem ponderada e deve ser sempre procurada a menor dose efetiva (Johnston, 2012).

2.6.3.3. Ciclosporina

A ciclosporina é um polipéptido cíclico, lipossolúvel com atividade imunossupressora. Bloqueia a transcrição de genes que codificam citocinas pró-inflamatórias como a IL-2 e a IL-4 inibindo a proliferação das células T. Ao suprimir o feedback positivo da ativação de células T pela IL-2, o processo inflamatório é minimizado. A ação deste fármaco é mais direcionada sobre as células T e em menor extensão sobre as células B (Papich, 2018). Uma vez que a população celular encontrada em casos de estomatite consiste predominantemente em linfócitos e plasmócitos, o uso da ciclosporina faz sentido como opção terapêutica (Lommer, 2013a). Um estudo que incluiu 16 gatos (Lommer, 2013a) mostrou que a terapêutica com ciclosporina administrada oralmente é bem tolerada e efetiva na redução da inflamação oral na maioria dos animais com estomatite refratária. O maior problema com o uso da ciclosporina é a variabilidade na sua absorção intestinal e o metabolismo hepático, resultando consequentemente em variações da sua biodisponibilidade. Os efeitos adversos incluem vômito e diarreia, alterações linf e mieloproliferativas, infeções secundárias decorrentes da imunossupressão e ainda alterações hepáticas e renais (Robson, 2003). Este fármaco encontra-se indicado em casos refratários com a dose de 2,5 mg/kg a cada 12 horas via oral com monitorização dos níveis plasmáticos em intervalos regulares (Lommer, 2013a).

2.6.3.4. Interferão ómega recombinante felino (rFeIFN- ω)

O interferão ómega recombinante felino (rFeIFN- ω) também tem sido estudado como terapêutica antiviral e imunomoduladora em casos de GECCF. Os interferões são citocinas que, ao se ligarem a recetores específicos na superfície celular, induzem a produção de certas enzimas que tornam o ambiente celular menos propício à replicação viral (Li et al., 2017). Estas citocinas também incitam uma resposta anti-inflamatória e anti-proliferativa e podem participar numa resposta

imunitária adaptativa além do seu papel na imunidade inata (Leal & Gil, 2016). Em 2003, Mihaljevic administrou rFeIFN- ω , por via intragengival e subcutânea, a 20 gatos com GEFC, 8 dos quais FIV positivos. A cura completa foi conseguida em 35% dos pacientes e 65% melhoraram significativamente. Mais recentemente, Hennes et al. (2011) demonstraram que o rFeIFN- ω possui efeito comparável com a terapia com glucocorticoides, com a vantagem de não possuir um mecanismo de ação imunossupressor. Muitos animais com GEFC já sofreram tratamentos repetidos com glucocorticoides e, derivado disso, podem desenvolver diabetes tipo II. Nestas situações em que os glucocorticoides estão contraindicados, o rFeIFN- ω revelou-se como uma alternativa terapêutica apropriada, ao induzir a melhoria das lesões orais (Leal et al., 2013).

2.6.3.5.Terapia celular

A terapia celular é um campo inovador na investigação científica com enorme potencial para aplicação clínica em Medicina Veterinária. As células tronco mesenquimais (*Mesenchymal Stem Cells* - MSCs) são células multipotentes que podem ser isoladas de vários tecidos, como o tecido adiposo, medula óssea, fígado, placenta e sangue do cordão umbilical (Arzi et al., 2017). A capacidade regenerativa das MSCs é atribuída, em parte, à sua capacidade de modular as respostas imunitárias inata e adaptativa. Estas células inibem a proliferação das células T, alteram a função das células B, suprimem o MHC II nas células apresentadoras de antígenos e inibem a maturação e diferenciação das células dendríticas (Arzi et al., 2015). As MSCs secretam também fatores bioativos que potenciam a angiogénese (Quimby & Borjesson, 2018). A utilização das células troncos mesenquimais derivadas do tecido adiposo (*Adipose-derived Mesenchymal Stem Cells* – aMSCs) em casos de GEFC foi estudada em dois ensaios clínicos, dada a predominância da ativação das células T nesta doença e a capacidade das aMSCs para diminuir a proliferação destas células. Em ambos os ensaios foram utilizados gatos com GEFC refratária às extrações dentárias sem outras doenças conhecidas (como FIV/FelV negativos). Em cada ensaio, sete gatos receberam duas doses intravenosas de aMSCs com 3 semanas de intervalo. No primeiro ensaio (Arzi et al., 2015) foram utilizadas aMSCs autólogas enquanto no segundo (Arzi et al., 2017) foram utilizadas aMSCs alogénicas, provenientes de gatos dadores SPF (*specific pathogen free*). Para ambos os estudos, a percentagem de cura ou de melhoria significativa foi de 64% (9/14 gatos). Não foram registados efeitos adversos significativos associados à administração das aMSCs e nenhum dos gatos sofreu nenhuma recaída. A cura clínica também se associou à

diminuição das células T e B na análise histopatológica. Arzi et al. (2015) concluíram, também, que gatos com valores inferiores a 15% de células T CD8+ citotóxicas responderam a 100% à terapia com aMSCs, enquanto gatos com valores superiores a 15% de células T citotóxicas CD8+ responderam fracamente. Deste modo, este biomarcador pode ser importante para prever a resposta clínica à terapia com aMSCs. As aMSCs autólogas têm sido usadas na medicina desde há cerca de dez anos sem terem sido reportadas reações adversas significativas. No entanto, o tempo necessário para o seu isolamento e proliferação de número de células suficiente para serem usadas como tratamento é extenso. Por outro lado, as aMSCs alogénicas têm a vantagem prática de maior disponibilidade, maior controlo de qualidade e padronização entre tratamentos, menor custo e redução dos eventos anestésicos para os pacientes. Contudo, as aMSCs alogénicas podem ter baixa imunogenicidade e podem provocar uma resposta imunitária inata e/ou a produção de anticorpos (Arzi et al., 2017).

O tratamento com aMSCs autólogas parece ser ligeiramente mais eficaz, especialmente em gatos com quadros clínicos mais graves, uma vez que as melhorias se fazem ver mais rapidamente após a administração das aMSCs autólogas do que após a administração de aMSCs alogénicas.

2.6.3.6. Tratamento com Laser

O laser pode ser usado cirurgicamente, normalmente recorrendo ao laser de dióxido de carbono (CO₂) ou laser díodo, ou terapeuticamente, muitas vezes através de lasers de baixa potência (*Low-level laser therapy* - LLLT) (Bellows, 2013). Relativamente ao uso do laser de CO₂ em animais com GECE, o objetivo é fulgurar o tecido inflamado, conduzindo à formação de tecido cicatricial, que, por sua vez, é menos provável de se tornar inflamado (Greenfield, 2017). Em 2007, uma equipa relatou o uso de laser de CO₂ para ablação do tecido proliferativo, tendo sido observada resolução completa de todas as lesões, sem recorrências um ano após o tratamento. No entanto é difícil determinar a magnitude da influência do laser na resolução da inflamação uma vez que paralelamente foi administrada prednisona e os dentes caninos do animal foram extraídos durante o tratamento (Lewis, Tsugawa, Reiter, & Tzt, 2007). Em 2017, Squarzone et al. recorreram ao laser terapêutico NIR (*Near Infrared*), que emite radiação laser numa faixa de comprimentos de onda próxima dos infra-vermelhos, em 10 gatos com GECE. Foram obtidas melhorias significativas, avaliadas pela regressão dos sintomas dos pacientes, bem como pela histologia e microscopia de imunofluorescência. No entanto, estes resultados são ainda muito preliminares, não sendo possível prever que a GECE possa ser controlada na totalidade pela

terapia a laser. Deste modo, a terapia com laser apresenta-se como uma opção no tratamento da GEFC mas os estudos devem ser ampliados, envolvendo um número maior de pacientes (Squarizoni, Bani, Cialdai & Monici, 2017).

2.6.3.7. Vacina para o Calicivirus Felino (CVF)

Uma vez que o calicivirus felino parece ter influência no desenvolvimento da GEFC (Lommer & Verstrate, 2003; Dowers et al., 2010; Fernandez et al., 2016; Nakanishi et al., 2018), a vacinação para o CVF revela-se importante. A vacinação previne a ocorrência de sinais clínicos agudos mas não previne a infecção e a excreção do vírus, nem protege contra todas as estirpes virais (Radford, Dawson, Coyne, Porter & Gaskell, 2006).

3. A resposta inflamatória

A resposta inflamatória aguda é uma reação complexa que ocorre devido a afeções inflamatórias tanto agudas como crônicas e o seu propósito é o restabelecimento da homeostasia e a remoção da sua causa. Quando a inflamação é generalizada, os efeitos sistêmicos são evidentes. Estes passam pela pirexia, fadiga, hiporrexia, mialgias e artralgias e devem-se à resposta imunitária inata desenvolvida (Cerón, Eckersall & Martinez-Subiela, 2005; Kann, Seddon, Henning & Meers, 2012).

Na maioria das vezes, a resposta inflamatória acontece devido à detecção de produtos microbianos ou parasíticos nos tecidos do hospedeiro. Nesta situação, os padrões moleculares associados a agentes patogénicos (*pathogen-associated molecular patterns* – PAMPs) são reconhecidos pelos recetores de reconhecimento de padrões (*pattern-recognition receptors* – PRRs) das células fagocitárias. Esta detecção de produtos microbianos estimula as células envolvidas na imunidade inata (como os macrófagos e em menor número os neutrófilos) a secretarem citocinas pró-inflamatórias, como a IL-1, a IL-6 e TNF- α que atuam sistemicamente. Apesar das infeções microbianas serem as causas mais comuns de inflamação, outros tipos de insultos também são capazes de produzir esta resposta – inflamação estéril. Estes podem ser do tipo traumático, corpos estranhos, lesões químicas ou desregulações da imunidade adaptativa. Muitas destas situações provocam a libertação de padrões moleculares associados a lesões (*damage-associated molecular patterns* – DAMPs), que, apesar da sua origem endógena, conseguem ativar as células fagocitárias (Kann et al., 2012; Callahan & Yates, 2014). As citocinas pró-inflamatórias induzem a expressão da ciclo-oxigenase 2 (COX-2) ao nível do hipotálamo, elevando o ponto

termostático do corpo. Consequentemente o animal tenta conservar a sua temperatura corporal através da vasoconstrição, dos tremores musculares e da febre (Tizard, 2013a).

A resposta inflamatória é ainda caracterizada por outras alterações sistêmicas como é o caso da leucocitose, aumento do cortisol sanguíneo, diminuição da concentração de tiroxina, alterações metabólicas e diminuição das concentrações sanguíneas de ferro e de zinco. Aquando deste fenómeno também são observadas variações na biossíntese hepática, o que modifica o perfil de proteínas plasmáticas circulantes. As proteínas plasmáticas que sofrem variações nas suas concentrações plasmáticas aquando de fenómenos inflamatórios são denominadas de proteínas de fase aguda (PFA) (Cray, Zaias & Altman, 2009).

3.1. Proteínas de fase aguda

Cerca de 90 minutos após o estímulo inflamatório, devido à libertação de IL-1, TNF- α e, especialmente, IL-6, os hepatócitos são estimulados a sintetizar e secretar proteínas. Apesar do fígado ser o maior produtor de proteínas de fase aguda (PFA), órgãos como o pulmão, intestino, glândula mamária e tecido adiposo têm revelado também serem responsáveis por esta síntese (Tizard, 2013a). Estas proteínas que sofrem um aumento na sua concentração sanguínea são denominadas de proteínas de fase aguda positiva (como a proteína C reativa, a proteína amiloide A sérica, a haptoglobina, a glicoproteína α 1-ácida, a ceruloplasmina e o fibrinogénio), enquanto as proteínas que sofrem uma diminuição na sua concentração sanguínea são denominadas de proteínas de fase aguda negativa (como a albumina ou a transferrina). As PFA positivas apresentam respostas principais (ou maiores), moderadas e menores. As PFA principais (como a proteína amiloide A sérica) possuem uma baixa concentração sérica ($<1\mu\text{g/L}$) em animais saudáveis e aumentam entre 100 a 1000 vezes após estimulação, ocorrendo um pico de concentração em 24 a 48 horas e diminuindo rapidamente aquando da recuperação. As PFA moderadas (como a glicoproteína α 1-ácida) sofrem um aumento de concentração de 5 a 10 vezes, atingindo o pico de concentração 2 a 3 dias após estimulação e diminuindo mais lentamente que as PFA principais. As PFA com respostas menores são aquelas que aumentam gradualmente a sua concentração entre 50 a 100% acima do seu nível normal. As PFAs negativas são aquelas em que suas concentrações diminuem pelo menos 25% do seu valor basal na resposta à inflamação (Paltrinieri, 2008; Eckersall & Bell, 2010).

A resposta inflamatória de fase aguda é uma componente importante da resposta imunitária inata, formando a primeira linha de defesa do hospedeiro aos agentes patogénicos e aos danos

tecidulares. Assim, a resposta inata e a produção de PFA antecedem a resposta imunitária adquirida. As proteínas de fase aguda desempenham papéis na regulação da resposta imunitária, inflamação, proteção contra infecção e na reparação de tecidos lesados. Apesar de variadas, as funções das PFA podem ser agrupadas. Certas PFA (como α 1-antitripsina e α 2-macroglobulina) têm atividade inibidora das proteases libertadas pelas células fagocitárias do sistema imunitário, de maneira a minimizar o dano provocado aos tecidos. Outras PFA (como a proteína amiloide A sérica, a haptoglobina e a proteína C reativa) ligam-se a metabolitos libertados pela catabolização celular de modo a que estes possam ser aproveitados em processos do hospedeiro, ao invés de serem utilizados pelo agente patogénico. Existem, ainda, PFAs com atividade antibacteriana e com capacidade de modularem a resposta imunitária (como a glicoproteína α 1-ácida, a proteína amilóide A sérica e proteína C reativa) (Eckersall, 2008).

Apesar de, por definição, a resposta inflamatória aguda durar apenas alguns dias, já foram descritos aumentos das PFA em situações de inflamação crónica (Kajikawa, Furuta, Onishi, Tajima, & Sugii, 1999).

3.1.1. A utilidade clínica das proteínas de fase aguda

Uma vez que a produção e libertação de proteínas de fase aguda (PFA) positivas é desencadeada após um estímulo inflamatório, a sua concentração começa a aumentar dentro de poucas horas, atingindo um pico de concentração em 24 a 48 horas, e permanece elevada enquanto o estímulo inflamatório persistir. Posto isto, as PFA podem ser úteis para a identificação precoce da inflamação e para a monitorização do desenlace do processo inflamatório. No entanto, qualquer estímulo inflamatório é capaz de induzir um aumento nas PFA, tornando-as pouco específicas. Assim, o clínico tem sempre que complementar a sua informação acerca do local, tipo e gravidade do processo inflamatório através dos sinais clínicos e outros exames complementares de diagnóstico (Paltrinieri, 2008).

A quantificação sérica das PFA principais é útil na diferenciação entre doenças com ou sem componente inflamatória, em situações em que os marcadores tradicionais de inflamação, como os leucócitos e a concentração de fibrinogénio, se mostram menos vantajosos. A resposta leucocitária apresenta uma diminuição na fase aguda da inflamação ou em casos de inflamação grave (como sépsis), antes da leucocitose se desenvolver. Deste modo, a interpretação da contagem leucocitária revela-se bastante dependente da altura em que a amostra é colhida. A concentração plasmática de fibrinogénio também é muitas vezes utilizada, no entanto, pode ser

influenciada por outros fatores que não a inflamação. Por exemplo, níveis diminuídos de fibrinogénio podem ser causados por coagulopatias ou permeabilidade vascular aumentada, mascarando assim a hiperfibrinogénemia causada pela inflamação e dificultando a interpretação dos resultados (Kjelgaard-Hansen & Jacobsen, 2011).

A partir do momento em que o estímulo inflamatório é eliminado, a concentração sérica das PFA começa a diminuir mais cedo que outros indicadores de doença (estes podem-se manter elevados até que as lesões induzidas pelo agente patogénico em causa desapareçam) porém, enquanto o agente patogénico permanecer no organismo, estes valores continuarão elevados. As medidas terapêuticas não parecem exercer efeitos diretos sobre as PFA principais, continuando os seus níveis séricos a refletir a atividade inflamatória durante o tratamento. Deste modo as PFA providenciam informação fidedigna do curso do tratamento instituído, podendo ser úteis na monitorização de doenças e na tomada de decisões clínicas (Paltrinieri, 2008).

No caso do gato, as PFA mais utilizadas numa abordagem de diagnóstico são a proteína amilóide A sérica e a glicoproteína α_1 -ácida (Petersen et al., 2004; Céron et al., 2005). Por sua vez, a proteína amilóide A sérica felina mostrou ser a PFA que mais rapidamente responde a uma variedade de condições inflamatórias (Kajikawa et al., 1999).

3.1.2. Proteína amilóide A sérica

A proteína amiloide sérica (SAA) pertence a uma família de proteínas que engloba diferentes apolipoproteínas, sintetizadas maioritariamente pelo fígado e que podem ser divididas em duas classes, dependendo da sua resposta a estímulos inflamatórios. As proteínas amiloide A séricas de fase aguda [Acute-phase serum amyloid A (A-SAA)] sofrem aumentos na sua concentração em cerca de 1000 vezes a sua concentração basal aquando de situações inflamatórias, podendo a sua concentração plasmática exceder 1mg/ml. As proteínas amiloides A séricas constitutivas [Constitutive serum amyloid A (C-SAAs)], ao contrário das A-SAAs, não sofrem indução aquando da resposta inflamatória aguda (Uhlir & Whitehead, 1999). Os fragmentos de aminoácidos terminais da SAA podem organizar-se e formar fibrilas altamente organizadas e insolúveis que se acumulam e originam os depósitos amiloides (Sack Jr, 2018).

3.1.2.1. Síntese

Após um estímulo inflamatório, a síntese de A-SAA é induzida através da ativação da cascata de citocinas pró-inflamatórias (Uhlir & Whitehead, 1999; Tizard, 2013). A síntese ocorre

maioritariamente no fígado e de seguida a A-SAA é secretada para o plasma onde circula associada a lipoproteínas de alta densidade (*High density lipoprotein* – HDL) (Eckersall, 2008). O tempo de semivida da A-SAA é de cerca de 90 minutos e o seu catabolismo também se dá a nível hepático (Kisilevsky & Manley, 2012). Durante a resposta inflamatória aguda ou situações de inflamação crónica, a capacidade do fígado de degradação de A-SAA diminui em 14% e 31%, respetivamente, contribuindo assim para os níveis elevados de A-SAA circulante observados nestas situações (Gollaher & Bausserman, 1990).

3.1.2.2. Funções da SAA

As funções da A-SAA ainda não são totalmente claras, sendo o seu papel na mobilização do colesterol o mais estudado.

Ao associar-se à HDL, A-SAA parece proporcionar à molécula a capacidade de modular o efluxo de colesterol dos macrófagos. Nas áreas de lesão existe uma grande acumulação de eritrócitos, detritos celulares e fragmentos de membranas, todos estes ricos em colesterol. O complexo A-SAA/HDL remove o colesterol fagocitado pelos macrófagos e entrega-o à HDL ao se desassociar desta. Deste modo são alcançadas duas finalidades: a desocupação dos macrófagos de modo a que possam voltar à sua função fagocítica e a transferência do colesterol para as HDL que o redistribuem para sistemas que o necessitem ou excretem (Kisilevsky et al., 2012).

Diversos estudos já descreveram os efeitos inibitórios que a A-SAA possa ter a nível da resposta imunitária, como a febre, a produção de prostaglandina E2, a ativação plaquetária, nos danos oxidativos causados pela libertação dos grânulos dos neutrófilos e produção de anticorpos (Jensen & Whitehead, 1998; Ye & Sun, 2015).

A capacidade de opsonização de bactérias Gram negativas pela SAA também já foi demonstrada (Hari-Dass et al., 2005; Shah et al., 2006; Ye & Sun, 2017). A SAA1 tem a capacidade de se ligar à proteína membranária A da *E.coli* e de, presumivelmente, outras bactérias Gram-negativas homólogas aumentando a sua fagocitose pelos PMNs (Hari-Dass et al., 2005; Shah et al., 2006).

3.1.2.3. Doseamento da SAA

Classicamente, a monitorização de processos inflamatórios era feita a partir do doseamento das proteínas totais e do rácio albumina:globulinas através da eletroforese de proteínas. Contudo, têm vindo a surgir análises específicas para as proteínas de fase aguda.

Através da eletroforese consegue-se distinguir a albumina e as quatro frações das globulinas: α_1 , α_2 , β e γ . Cada uma destas frações é composta por PFA e/ou imunoglobulinas. As globulinas α_1 incluem α_1 -antitripsina e α_1 -glicoproteína ácida; as globulinas α_2 incluem α_2 -macroglobulina e haptoglobina; as globulinas β incluem a transferrina, SAA, fibrinogénio e proteína C reativa; e as globulinas γ compreendem principalmente IgG (Eckersall, 2008, Cray et al., 2009).

PFA específicas já foram analisadas através de inúmeras técnicas como ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay), radioimunoensaios, nefelometria, imunoturbidimetria, Western Blot e análises de RNAm. Idealmente devem ser feitas análises específicas à espécie em estudo, uma vez que há reações cruzadas entre espécies para uma variedade de proteínas séricas. Existem kits ELISA para o doseamento de PFA específicas, como a SAA, a CRP e a haptoglobina. No entanto costumam ser dispendiosos (Eckersall, 2008; Cray et al., 2009; Tizard, 2013b).

Apesar destes progressos, o facto de as PFA variarem na sua resposta à inflamação e dano tecidual faz com que a análise de apenas uma PFA se torne limitada. Deste modo é aconselhável dosear várias PFA ao invés da apenas uma. Este perfil de PFA deve incluir PFAs positivas e negativas, além de PFA que aumentam rapidamente e outras que aumentam lentamente, de modo a se obter uma melhor informação correlacionável com a gravidade do processo inflamatório (Céron, Eckersall & Martínez-Subiela, 2005; Cray et al., 2009).

As variações séricas da SAA no caso do gato ainda não foram bem estabelecidas. Os valores médios para gatos saudáveis têm sido díspares, desde 16,6 μ g/L (Kajikawa et al., 1999), 0, 6 μ g/L (Sasaki et al., 2003) e 1,8 μ g/L (Kann et al., 2012). Porém, vários estudos já relataram valores iguais ou superiores a 5 g/L em gatos afetados por diferentes doenças (Kajikawa et al., 1999; Sasaki et al., 2003; Paltrinieri, 2008; Kann et al., 2012).

PARTE III – VARIAÇÃO DOS NÍVEIS DE PROTEÍNA SÉRICA AMILÓIDE A COMO MARCADOR INFLAMATÓRIO NA GENGIVOESTOMATITE CRÓNICA FELINA

1. Objetivos

Este estudo tem como objetivo testar a hipótese de que a SAA pode ser usada como biomarcador na monitorização da resposta terapêutica em casos de gengivoestomatite crónica felina após extrações dentárias. Para este fim foram determinados os níveis de SAA nos animais doentes, comparando-os com um grupo controlo, e aos 30 e 60 dias pós-operatórios.

2. Materiais e métodos

2.1. Amostra

A amostra deste estudo foi constituída por 20 animais: 10 casos e 10 controlos. O grupo casos foi constituído por animais com diagnóstico de GECF, e o grupo controlos por animais emparelhados para doença dentária, sem outras doenças diagnosticadas, atendidos no Hospital Escolar Veterinário da Faculdade de Medicina Veterinária (HEV-FMV) e na Clínica Veterinária ANIAID, mediante assinatura de consentimento informado de participação no estudo. A recolha de amostras ocorreu no âmbito de outro projeto sendo que a reutilização das amostras do estudo anterior obteve a autorização da Comissão de Ética e Bem-Estar Animal (CEBEA) da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa.

2.1.1. Critérios de inclusão

Grupo de casos: foram incluídos gatos com GECF, com idades entre os 2 e os 13 anos de idade, sem co-morbilidades diagnosticadas através do exame físico e análises sanguíneas (hemograma e painel bioquímico básico – proteínas totais, albumina, ureia e creatinina – sem alterações e análise de anticorpos FIV e FeLV negativos).

Grupo controlo: este grupo incluiu animais com idades compreendidas entre os 6 meses e os 18 anos, sem sinais de GECF ou de doença sistémica, embora com sinais de outras doenças dentárias nomeadamente doença periodontal e lesões de reabsorção dentária. Estes animais apresentaram análises pré-cirúrgicas – as mesmas descritas para o grupo de casos – sem alterações realizadas previamente a cirurgias eletivas (orquiectomia, ovariectomia, nodulectomia e tratamentos dentários (Complete Oral Health Assessment and Treatment (COHAT)).

2.1.2. Critérios de exclusão

Os animais que apresentavam alterações hematológicas compatíveis com a presença de doença sistêmica, neoplasia, doença renal, entre outras, foram excluídos do estudo. Do mesmo modo, animais positivos aos retrovírus felinos FIV e FeLV, e animais medicados com fármacos imunossupressores, foram igualmente rejeitados no estudo.

2.2. Procedimentos

2.2.1. Questionário aos tutores

Previamente à admissão do animal para o procedimento cirúrgico, foi realizado um questionário aos tutores dos animais que integraram o grupo de casos. Este questionário incidiu em questões acerca do estado de vacinação do animal, o modo de vida (se tem acesso ao exterior ou se vive exclusivamente dentro de casa), sinais clínicos e cronicidade dos mesmos, presença de doenças concomitantes e opções terapêuticas experimentadas previamente (Anexo I). Os tutores foram também inquiridos acerca da alimentação do animal, a higiene diária do mesmo, a atividade física e a percepção do tutor acerca do nível de conforto do seu animal (Anexo II). Estas questões foram repetidas aos 30 e 60 dias pós-extrações dentárias como parte da avaliação da eficácia do tratamento.

2.2.2. Procedimento anestésico

No momento da realização das extrações dentárias, a pré-medicação dos gatos em estudo consistiu numa combinação anestésica de metadona, quetamina e dexmedetomidina administrada pela via intra-muscular. A metadona foi usada na dosagem de 0,5 mg/kg, a quetamina na dosagem de 5 mg/kg e a dexmedetomidina na dosagem de 0,05 mg/kg. A indução anestésica foi realizada com propofol na dosagem de 1 mg/kg pela via intra-venosa. A anestesia foi mantida de forma volátil com isoflurano através de circuito semi-aberto. Foi realizada fluidoterapia intra-venosa com cloreto de sódio isotónico (NaCl a 0,9%) na dose de manutenção cirúrgica (10 ml/kg/h).

2.2.3. Exame estomatológico-dentário

O exame estomatológico-dentário foi realizado sob anestesia geral ou sedação em todos os animais aquando da recolha de sangue para doseamento de SAA. Foi utilizado um sistema de avaliação das lesões, com classificação da bucoestomatite e da estomatite caudal em 5 graus,

sendo a cavidade oral dividida em quatro quadrantes (maxila direita, maxila esquerda, mandíbula direita e mandíbula esquerda). O grau 0 corresponde a ausência de lesão; o grau 1 corresponde a inflamação ligeira, não ulcerativa, não proliferativa, não sangrante espontaneamente e não sangrante quando aplicada um ligeira pressão; o grau 2 corresponde a inflamação moderada, não ulcerativa, não ou ligeiramente proliferativa, não sangrante espontaneamente e não sangrante quando aplicada um ligeira pressão; o grau 3 corresponde a inflamação moderada, ulcerativa ou ulcero-proliferativa, não sangrante espontaneamente mas sangrante quando aplicada uma ligeira pressão e o grau 4 corresponde a inflamação grave, ulcerativa ou ulcero-proliferativa, sangrante espontaneamente. Foi também classificada a área total das lesões sendo atribuída uma classificação de 0 a 6 em que: 0 corresponde ausência de área de lesão, 1 corresponde a área total de 0 até 0,5 cm², 2 corresponde a área total de 0,5 até 1 cm², 3 corresponde a área total de 1 até 2 cm², 4 corresponde a área total de 2 até 3 cm², 5 corresponde a área total de 3 até 4 cm² e 6 corresponde a área total superior a 4 cm² (Anexo III).

2.2.4. Radiografias dentárias

Todos os animais do grupo casos foram submetidos a radiografias dentárias antes e após o tratamento cirúrgico. Nos animais do grupo controlo também foram realizadas radiografias intraorais aos animais com mais de 6 meses de idade. Este exame foi realizado antes (e após, no caso de COHAT) da intervenção a que foram submetidos. O equipamento de raios-X utiliza constantes radiográficas fixas de 65 kV e 6 mA, podendo-se ajustar o intervalo de tempo de exposição entre 0,01 a 1 segundos. Foram utilizadas técnicas paralelas para a obtenção de imagens de molares e pré-molares mandibulares e técnicas de bisettriz para os restantes dentes.

2.2.5. Outros exames complementares de diagnóstico

Em todos os casos foi feita uma zaragatoa oral pesquisa de Calicivírus felino (FCV) para caracterização da doença e uma biópsia gengival para confirmação do diagnóstico de GEFC. A pesquisa de FCV foi feita através de reação em cadeia de polimerase (PCR) em tempo real no Laboratório de Virologia e Imunologia da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa e Laboratório DNAtch. A biópsia gengival foi analisada pelo Laboratório de Anatomia Patológica da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa. A presença de FCV também foi pesquisada nos animais pertencentes ao grupo controlo.

2.2.6. Tratamento dentário

Todos os animais foram intervencionados sob anestesia geral. Os animais foram posicionados em decúbito dorsal pois esta posição permite uma visualização da totalidade da cavidade oral e proporciona uma orientação adequada da sonda periodontal. Durante o exame, para além da inspeção visual da cavidade oral, foram utilizadas sondas exploratórias periodontais de modo a classificar a profundidade do sulco gengival e a exposição da furca dentária e foi avaliada a presença de mobilidade dentária. Deste modo, após avaliação completa da cavidade oral e execução de radiografias intra-orais, a cavidade oral foi lavada com uma solução de clorexidina a 0,2% e foram realizados bloqueios anestésicos regionais previamente às extrações dentárias com lidocaína. Para este efeito foram instilados, normalmente, 0,2 ml de lidocaína a 2% por ponto de instilação não excedendo a dose de 2 mg/kg de dose sistémica. Efetuaram-se bloqueios caudais maxilares e bloqueios caudais mandibulares ambos bilaterais. O tratamento dentário consistiu na destarização e polimento dentário, seguido de extrações dentárias de todos os dentes que apresentassem lesões identificadas no exame oral ou radiográfico ou que se encontrassem localizados em zonas de elevada inflamação (nalguns casos foram extraídos apenas os pré-molares e molares, enquanto que noutros foram extraídos todos os dentes). As exodontias foram realizadas mediante a técnica fechada, em casos de dentes uni-radiculares pequenos, e mediante a técnica aberta ou cirúrgica, essencialmente no caso dos dentes caninos e primeiros molares mandibulares. No caso da técnica aberta recorreu-se a técnicas de gengivoplastia, alveolotomia, odontosecção de dentes multiradiculados, osteotomia da crista óssea no caso da existência de zonas afiladas e encerramento com suturas simples interrompidas ou contínuas de fio reabsorvível monofilamentoso 5/0. Foi realizada antibioterapia intra-cirúrgica com Cefazolina na dose de 22 mg/kg e administrado anti-inflamatório não esteroide, como o Meloxicam na dose de 0,05-1 mg/kg. Na alta clínica foi prescrita antibioterapia, analgesia, anti-inflamatório não esteroide e um gel desinfetante.

2.2.7. Recolha de amostras sanguíneas para doseamento de SAA

Foi recolhida uma amostra de 2 ml de sangue para tubo seco a todos os animais – casos e controlos – previamente à intervenção cirúrgica a realizar. Após um período de repouso de 30 minutos estas amostras foram centrifugadas (7000 rpm durante 5 minutos) de modo a obter-se soro sanguíneo. O soro foi armazenado a -20°C até à altura do doseamento de SAA. Nos animais com GECS, este procedimento foi repetido aos 30 e 60 pós extrações dentárias.

2.2.8. Classificação da resposta ao tratamento

Os procedimentos de avaliação visual das lesões e questionário aos donos foram repetidos aos 30, 60 dias pós-operatórios. A avaliação visual incidiu sobre o grau de estomatite caudal e mucosite alveolar nos quatro quadrantes e sobre a área total das lesões, utilizando-se o mesmo sistema de avaliação das lesões usado previamente às extrações dentárias.

O questionário aos donos foi idêntico ao realizado anteriormente às extrações dentárias em que é classificado o apetite, o nível de atividade, a limpeza e higiene e a percepção do nível de conforto do animal em 4 graus.

Após terem sido todos recolhidos, estes valores foram analisados estatisticamente.

A resposta ao tratamento foi avaliada mediante a atribuição de um parâmetro numérico, denominado de eficácia do tratamento (EDT), para caracterizar a resposta de cada gato ao tratamento cirúrgico. Esta classificação teve por base estudos anteriores (Bellei et al., 2008; Jennings, 2015).

- Grau EDT 0 (zero): gatos sem evolução favorável ou que pioraram clinicamente após extração total ou parcial.
- Grau EDT 1 (um): gatos que apresentem uma ligeira melhoria após as extrações parciais ou totais, com permanência de alguns sinais clínicos.
- Grau EDT 2 (dois): gatos com melhoria significativa (sem sinais clínicos aparentes) após as extrações parciais ou totais.
- Grau EDT 3 (três): gatos que apresentem resolução completa após as extrações parciais ou totais – cura clínica (Oliveira, 2017).

Neste trabalho a classificação foi ainda agrupada em insucesso ou sucesso correspondendo ao agrupamento das classificações 0 e 1 ou 2 e 3, respetivamente.

2.2.9. Doseamento da SAA

O doseamento da SAA foi realizado através de um *kit* de ELISA disponível no mercado (Cat SAA ELISA Life Diagnostics, Inc.). Este ensaio utiliza dois anticorpos purificados de SAA felina; um imóvel na fase sólida e um conjugado com peroxidase de rábano para a deteção. Após desnaturação das amostras de soro, estas são diluídas e incubadas na placa de microtitulação com os anticorpos de conjugação, o que resulta no aprisionamento das moléculas de SAA entre os anticorpos da fase imóvel e os anticorpos de deteção. Esta reação origina uma cor azul nos poços. Ao ser adicionada uma solução de paragem, a cor passa a amarelo e pode ser medida a

absorvância a 450 nm (A450) num espectrofotômetro. A concentração de SAA é proporcional à absorvância e é calculada através de uma curva padrão feita através da relação entre os valores de absorvância a 450 nm das concentrações padrão de SAA fornecidas pelo fabricante, como está ilustrado na tabela 1.

Para obtenção da concentração real da amostra sérica, os valores da concentração derivada da absorvância em ng/ml são multiplicados pelo fator de diluição, obtendo-se os valores séricos em µg/ml.

Tabela 1 – Valores médios de absorvância (450nm) das concentrações padrão de SAA fornecidas no kit.

Concentração dos padrões (ng/ml)	Média de Absorvância (450nm)
0,94	0,30745
1,88	0,4208
3,75	0,7479
7,5	1,058
15	1,49905

2.2.10. Análise estatística

Todos os dados e resultados foram registados numa folha de cálculo do programa Microsoft® Excel® 2013. Através deste programa foi calculada a estatística descritiva e foram feitos gráficos de barras. A estatística inferencial foi calculada através do *software* IBM SPSS Statistics Data Editor®. Neste programa foi usado o Teste Mann Whitney de modo a comparar as médias dos graus dos sinais clínicos e avaliação visual ao longo do projeto e de modo a comparar os valores de SAA no dia 0 no grupo controlo e no grupo casos e foi usado o Teste Wilcoxon Signed-Rank para comparar os valores de SAA nos animais do grupo casos ao longo do estudo. Foi também utilizada a correlação de Spearmann com o intuito de averiguar possíveis relações entre as concentrações de SAA obtidas e os graus de sinais clínicos, avaliações visuais e EDT.

3. Resultados

3.1. Caracterização da amostra

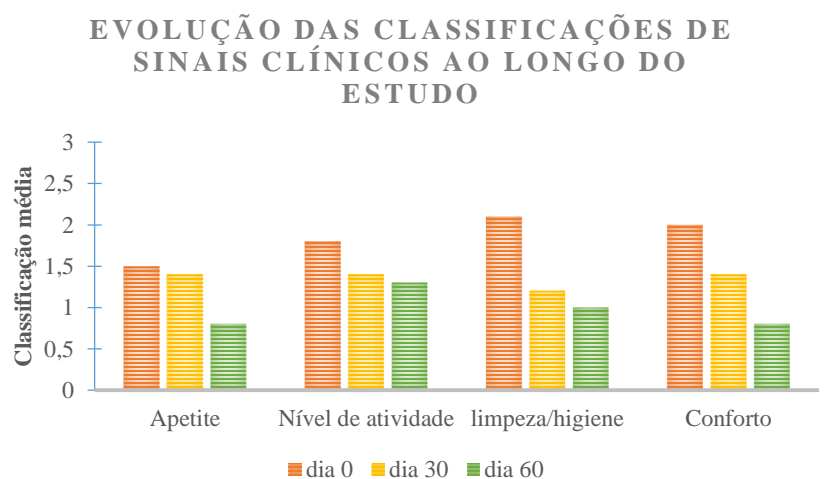
A amostra deste estudo consistiu em 20 animais ao todo: 10 pertencentes ao grupo estudo, e 10 pertencentes ao grupo controlo. Dos 20 animais em estudo, 10 eram machos (50%) e 10 eram fêmeas (50%), com um peso vivo médio de 3,886kg (3,904kg no grupo de estudo e 4,287kg no grupo controlo). A idade média da amostra foi de 6,535 anos de idade (7,3 anos no grupo de estudo e 6,8 anos de idade no grupo controlo), sendo que o grupo estudo era composto por animais com idades compreendidas entre os 2 e os 13 anos de idade enquanto o grupo controlo foi composto por animais com idades entre os 6 meses e os 18 anos de idade. Nos anexo IV e V encontram-se os dados completos referentes à caracterização da amostra.

3.2. Sinais clínicos

Em primeira instância, é de referir que apenas um dos 10 animais com GECF apresentava sinais há menos de 6 meses

Os resultados dos questionários realizados aos tutores acerca dos sinais clínicos (questionário realizado no Anexo II), encontram-se no Anexo VI. A partir da análise do gráfico 1, é possível testemunhar uma diminuição das classificações de apetite, nível de atividade, higiene e conforto ao longo do período de estudo, o que reflete uma melhoria dos sinais clínicos avaliados. Nas variáveis limpeza/higiene e conforto foram verificadas diferenças estatísticas significativas ($p=0,027$ e $p=0,019$).

Gráfico 1 – Evolução das médias das classificações de apetite, nível de atividade, limpeza e higiene e conforto aos 0, 30 e 60 dias pós-extrações dentárias.



Os resultados da avaliação visual das lesões de GECF aos 0, 30 e 60 dias, encontram-se resumidos no anexo VII. Apesar das médias destes valores terem diminuído do dia 0 para o dia 60, não foram verificadas diferenças estatísticas significativas. A estatística inferencial relativa às avaliações visuais das lesões ao longo do estudo está demonstrada na tabela 2.

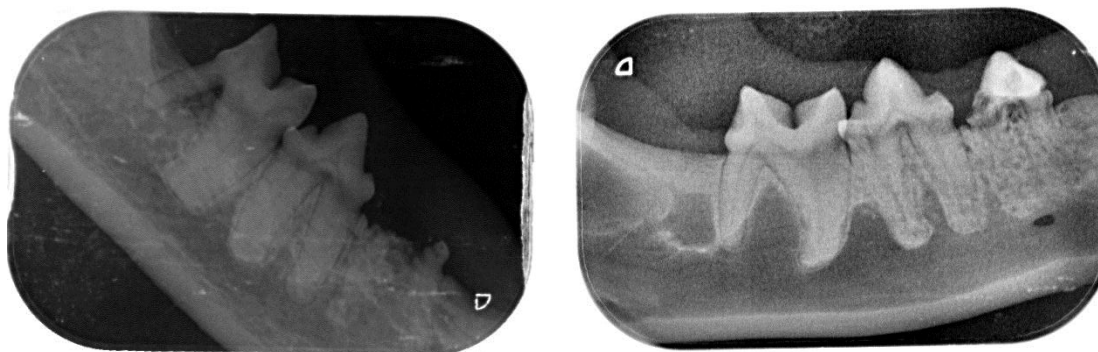
Tabela 2- Estatística inferencial das classificações das avaliações visuais das lesões ao longo do estudo.

Avaliação visual das lesões		Estomatite caudal				Bucoestomatite				Área total das lesões			
		Dias pós-operatórios			p-value	Dias pós-operatórios			p-value	Dias pós-operatórios			p-value
		0	30	60		0	30	60		0	30	60	
Média		3,15	2,85	2,65	0,124	2,45	2,15	1,90	0,269	5,50	5,10	4,60	0,099
Desvio padrão		0,71	0,71	0,91		1,17	0,88	0,99		0,71	0,88	1,35	
IC de 95%	Limite superior	5,86	3,29	3,22		3,17	2,70	2,52		5,94	5,64	5,44	
	Limite inferior	2,71	2,41	2,08		1,73	1,60	1,28		5,06	4,56	3,76	

3.3. Radiografias dentárias

Relativamente às radiografias dentárias realizadas ao grupo de casos, apenas um destes animais não apresentava lesões de reabsorções dentárias, sendo o caso do animal 9E. Nos animais pertencentes ao grupo controlo, também apenas um dos nove animais em que foram realizadas radiografias intraorais, o controlo 10C, não apresentava lesões de reabsorção dentária.

Figura 2 – Radiografias dentárias realizadas a um gato do grupo casos (imagem da esquerda) e a um gato do grupo controlo (imagem da direita). Em ambas as radiografias são visíveis lesões de reabsorção dentária no terceiro pré-molar mandibular.



3.4. Pesquisa de Calicivirus felino

A pesquisa de Calicivirus felino através de PCR foi feita a todos os animais de ambos os grupos. No grupo de casos, todos os animais revelaram resultados positivos para a presença de FCV. Por outro lado, a totalidade dos animais do grupo obteve resultados negativos na PCR para calicivirus

3.5. Análise histopatológica

Relativamente à biópsia gengival para confirmação do diagnóstico de GECE, em todos os casos o relatório histopatológico descreveu infiltração exuberante da mucosa gengival por linfócitos e plasmócitos. Cerca de 50% dos animais apresentaram também infiltração da mucosa por neutrófilos. Também se revelou frequente a presença de células de Mott e de plasmócitos com inclusão de imunoglobulinas (Ig), também denominadas de corpúsculos de Russel. Alguns animais demonstraram existência de áreas de erosão e exsudação e em nenhum caso foram observados agentes microbianos específicos. Segundo a classificação de Harley et al., 2011, todas as lâminas (10/10) foram qualificadas como gengivoestomatite linfoplasmocitária grave, com o grau máximo de inflamação (grau 3).

3.6. Resposta ao tratamento

A classificação da resposta ao tratamento instituído aos 10 gatos do grupo de casos está representada na tabela 3. A partir da análise desta é possível testemunhar que metade dos animais responderam favoravelmente ao tratamento cirúrgico e 40% destes obtiveram a cura clínica.

Tabela 3 – Classificação da resposta ao tratamento cirúrgico

Gato	EDT	Classificação
1E	0	Insucesso
2E	3	Sucesso
3E	2	Sucesso
4E	3	Sucesso
5E	1	Insucesso
6E	1	Insucesso
7E	2	Sucesso
8E	1	Insucesso
9E	0	Insucesso
10E	2	Sucesso

3.7. Resultados do doseamento de SAA

A média dos valores de SAA dos gatos controlo foi de $0,115 \pm 0,19$ $\mu\text{g/ml}$. Os valores individuais estão representados na tabela 4. **Tabela 4** – Concentração de SAA obtida nos gatos do grupo controlo.

Animal	SAA ($\mu\text{g/ml}$)
1C	0,584
2C	0,059
3C	0,115
4C	0
5C	0
6C	0
7C	0,324
8C	0
9C	0
10C	0,064

Uma vez que algumas das amostras apresentavam valores de absorvância demasiado pequenos para serem convertidos em concentração sérica, foi atribuído o valor de 0 mg/ml para efeitos de análise estatística. Por outro lado, algumas das amostras muito provavelmente apresentavam medições com valores superiores ao intervalo de absorvância (0-4) lida pelo espectrofotómetro no comprimento de onda selecionado (450 nm), sendo que neste caso, utilizou-se o valor máximo de 4,424 $\mu\text{g/ml}$.

A média de valores de SAA no grupo de estudo aos dias 0, 30 e 60 foi de $3,989 \pm 1,38$ $\mu\text{g/ml}$, $2,836 \pm 2,05$ $\mu\text{g/ml}$ e $2,716 \pm 0,14$ $\mu\text{g/ml}$, respetivamente. Os valores individuais estão expressos na tabela 5.

Tabela 5 – Concentrações de SAA obtidas nos gatos do grupo casos (pré e pós-extrações dentárias)

Animal	SAA ($\mu\text{g/ml}$)			Variação T1 (%)		Variação T2 (%)		Variação T3 (%)	
	D0 ($\mu\text{g/ml}$)	D30 ($\mu\text{g/ml}$)	D60 ($\mu\text{g/ml}$)	Dim.	Aum.	Dim.	Aum.	Dim.	Aum.
1E	>4,424	0	0	100%		0%	0%	100%	
2E	0,069	0	0,404	100%			100%		485,50%
3E	>4,424	>4,424	0,207	0%	0%	95,30%		95,30%	
4E	>4,424	0,137	0	96,90%		100%		100%	
5E	>4,424	>4,424	>4,424	0%	0%	0%	0%	0%	0%
6E	>4,424	4,011	>4,424	9,30%			10,30%	0%	0%
7E	>4,424	>4,424	>4,424	0%	0%	0%	0%	0%	0%
8E	>4,424	2,09	>4,424	52,80%			111,70%	0%	0%
9E	>4,424	>4,424	>4,424	0%	0%	0%	0%	0%	0%
10E	>4,424	>4,424	>4,424	0%	0%	0%	0%	0%	0%

T1: Entre D0 e D30; T2: Entre D30 e D60; T3: Entre D0 e D60. Dim.: Diminuição; Aum.: Aumento.

A partir da análise da tabela 5 podemos observar que apenas em 3 dos animais com GECF ocorreu uma diminuição da concentração de SAA entre o dia 0 e o dia 60 (T3). No entanto, apesar de nestes casos a diminuição ter sido de grande magnitude, não foram encontradas diferenças estatísticas significativas entre a concentração sérica de SAA no dia 0 e no dia 60 ($p=0,141$).

Tabela 6 – Relação entre a presença de lesões de reabsorção dentária (LRD) e concentração de SAA no dia 0.

Animal	RD	SAA ($\mu\text{g/mL}$) D0
1E	Presente	>4,424
2E	Presente	0,069
3E	Presente	>4,424
4E	Presente	>4,424
5E	Presente	>4,424
6E	Presente	>4,424
7E	Presente	>4,424
8E	Presente	>4,424
9E	Ausente	>4,424
10E	Presente	>4,424

Analisando a tabela 6 é possível comparar a concentração sérica de SAA no dia 0 com a presença/ausência de lesões de reabsorção dentária nos animais do grupo casos. Nesta amostra de animais não se observou uma correlação significativa entre estes dois fatores

3.7.1. Comparação de grupos

Foram encontradas diferenças estatísticas significativas ($p=0,000$) entre as médias da concentração sérica de SAA do grupo controlo ($0,1146 \pm 0,193 \mu\text{g/mL}$, IC 95%) e do grupo de estudo ($3,9885 \pm 1,377 \mu\text{g/mL}$, IC 95%). Os resultados da análise estatística dos níveis séricos de SAA nos dois grupos de estudo estão representados na tabela 7.

Tabela 7 – Resultados da análise estatística inferencial dos níveis séricos de SAA nos dois grupos de estudo (grupo controle e grupo casos).

		SAA (µg/ml)	
		Grupo Controle	Grupo Casos
Média		0,1146	3,9885
95% IC para a média	Limite Inferior	-0,0235	3,0033
	Limite Superior	0,2527	4,9737
Desvio-padrão (σ)		0,193	1,377
Valor mínimo		0	0,069
Valor máximo		0,584	4,424

3.7.2. Relação entre a variação de SAA e a recuperação

A tabela 8 resume a média de valores séricos de SAA por tipo de lesão encontrada. Através desta é possível testemunhar que foram encontradas correlações estatisticamente significativas entre o grau de bucoestomatite no dia 30 e a concentração sérica de SAA nessa mesma altura ($p=0,008$) e entre a área total de lesão no dia 30 e o nível sérico de SAA nesse mesmo tempo ($p=0,022$).

Relativamente aos sinais clínicos, a única relação estatisticamente significativa encontrada nesta amostra de animais foi entre a concentração sérica de SAA aos 60 dias pós-extrações dentárias e o apetite nesta mesma altura ($\rho=-0,721$; $p=0,019$).

Tabela 8 – Correlação entre a média da concentração sérica de SAA nos diferentes períodos estudados e a média do grau das lesões encontradas no dia 60.

	D0	D30	D60
SAA (mg/mL)	média: 3,989 mg/mL σ : 1,38	média: 2,836 mg/mL σ : 2,05	média: 2,716 mg/mL σ : 0,14
Estomatite caudal	média: 3,15 σ : 0,71 $\rho=0,561$; $p=0,092$	média: 2,85 σ : 0,71 $\rho=0,304$; $p=0,392$	média: 2,65 σ : 0,91 $\rho=0,126$; $p=0,728$
Bucoestomatite	média: 2,45 σ : 1,17 $\rho=0,525$; $p=0,119$	média: 2,15 σ : 0,88 $\rho=0,777$; $p=0,008$	média: 1,9 σ : 0,99 $\rho=0,397$; $p=0,259$
Área total das lesões	média: 5,5 σ : 0,71 $\rho=0,349$; $p=0,332$	média: 5,1 σ : 0,88 $\rho=0,708$; $p=0,022$	média: 4,6 σ : 1,35 $\rho=0,465$; $p=0,175$

ρ = coeficiente de correlação

A tabela 9 compara as concentrações médias de SAA nos grupos dos animais com sucesso (2 e 3) e insucesso (0 e 1) terapêutico doseadas no primeiro e último tempo estudados. Apesar da diminuição observada em ambos os grupos, não foram encontradas diferenças estatísticas significativas entre a concentração sérica de SAA no dia 0 e no dia 60 nos dois grupos ($p=0,317$ e $p=0,345$, respetivamente).

Do mesmo modo, não se observou uma correlação significativa entre a EDT e a média de SAA sérica nestes dois períodos de tempo ($p=0,161$ e $p=0,410$, respetivamente).

Tabela 9 – Valores médios de concentração de SAA no primeiro e último tempo estudado por grupos de EDT.

EDT	Média de SAA ($\mu\text{g/ml}$)	
	Dia 0	Dia 60
Insucesso (0 e 1)	4,424	3,540
Sucesso (2 e 3)	3,553	1,892

4. Discussão

O presente projeto teve como objetivo testar a hipótese de que existe um estado inflamatório sistémico crónico associado à Gengivoestomatite Crónica Felina, bem como o interesse da proteína amiloide A sérica como biomarcador na monitorização da resposta terapêutica em casos de GEFCF após extrações dentárias. O desenho deste estudo foi do tipo caso-controlo prospetivo, de modo a melhor avaliar a eficácia do tratamento e descartar a possibilidade de existência de comorbilidades que pudessem alterar os valores de SAA (como doenças inflamatórias crónicas, neoplasias, endocrinopatias e doenças infecciosas, como seja o FIV e o FeLV).

Todos os animais do grupo de casos e controlo foram submetidos a pesquisa de FCV pelo método de PCR. A pesquisa de FCV nos animais do grupo controlo foi negativa em todos os casos. A pesquisa de FCV deveu-se relação do vírus com a GEFCF, possuindo uma prevalência variável nestes casos. Estudos anteriores relatam desde prevalências superiores a 70% (Thomson et al., 1984; Knowles et al., 1989), a prevalências entre os 40% e os 63% (Dowers et al., 2010; Belgard et al. 2010, Fernandez et al., 2017, Nakanishi et al., 2018). No presente estudo, todos os animais com GEFCF obtiveram resultado positivo na pesquisa de FCV e todos os controlos foram negativos para a presença do vírus. Estas variações podem ser produto da metodologia utilizada,

dado que, enquanto neste estudo e nos de Belgard et al. (2010), Fernandez et al. (2017) e Nakanishi et al. (2018), foi utilizado o PCR em tempo real em zaragatoas orais, nos restantes estudos foram utilizadas outras técnicas como o isolamento viral (Thomson et al, 1984; Lommer & Verstraete, 2003), o PCR em amostras de tecido (Dowers et al., 2010) e a pesquisa serológica de anticorpos (Quimby et al., 2008). É também possível que os agentes patogénicos não se encontrem distribuídos de igual forma por toda a extensão da cavidade oral e deste modo podem não ser colhidos no processo de recolha da amostra. A possibilidade de o vírus se encontrar em maior profundidade nos tecidos também faz com que esfregaços muito superficiais revelem valores falsos negativos. Daí a necessidade de causar alguma esfoliação ao friccionar os tecidos orais com a zaragatoa. No presente estudo, todos os animais doentes apresentavam um quadro clínico homogéneo, com lesões orais graves, sendo a esfoliação fácil. Outros fatores como incoerências no armazenamento e transporte de amostras também podem afetar os resultados. Existe igualmente a hipótese de que a GECE pode ser causada por uma reação de hipersensibilidade contra microrganismos, levando a uma eliminação destes e assim a resultados falsos negativos através das técnicas de PCR, RT-PCR e isolamento viral (Quimby et al., 2008). Por último, o facto de o FCV ter uma fase latente no seu ciclo de vida faz com que os resultados possam apenas ser positivos intermitentemente (Hargis & Ginn, 1999).

Os resultados obtidos no presente estudo suportam a hipótese de que o FCV desempenha um papel na etiologia da GECE. Apesar de só se conhecer um biótipo de FCV, há uma grande variedade de estirpes virais com diferenças na sua antigenicidade e patogenicidade. O facto de existirem reações cruzadas entre estas permite a sua classificação num só serótipo (Radford, 2009; Afonso et al., 2017). Sabe-se existir diferenças antigénicas entre os calicivirus causadores de quadros de estomatite e os calicivirus geradores de doença respiratória aguda. Outra diferença antigénica acontece nos isolados de infeções crónicas relativamente os isolados de infeções agudas. É sugerido que aquando de infeções crónicas, a pressão imunológica induz uma série de mutações, culminando em variações antigénicas, constituindo um mecanismo de escape para o vírus. Isto pode resultar na emergência de isolados cada vez mais distintos uns dos outros (Poulet et al., 2000). É uma hipótese que exista uma ou várias estirpes com maior tropismo para a mucosa oral, conduzindo ao desenvolvimento de GECE. Outra hipótese é a da existência de mais que um biótipo de FCV, sendo um deles responsável pelo quadro clínico de estomatite crónica. Esta hipótese advém de se conhecerem outros vírus com esta particularidade, como o

Coronavírus Felino e o vírus da Peritonite Infeciosa Felina, dois biótipos virais pertencentes à família Coronaviridae mas com patogenicidade distinta (Ehmann et al., 2018; Rosa, 2018).

Também já foi sugerido que a GECF deriva de uma resposta imunitária anormal a uma infecção persistente de FCV, independentemente da estirpe (Reubel, Hoffmann, & Pedersen, 1992; Rosa, 2018). Estudos relatam cerca de 8% (Berger et al., 2015), 14% (Berlart et al., 2010) e 20% (Tenorio et al., 1991) de gatos clinicamente saudáveis são portadores de FCV e não desenvolvem lesões de estomatite. Uma das hipóteses proposta por Reubel et al. (1992) é que estes animais vivem numa relação hospedeiro-parasita perfeitamente equilibrada, enquanto os animais com uma resposta imunitária anormal a esta infecção acabam por desenvolver um quadro de estomatite crónica.

É provável que uma resposta imunitária aberrante por parte do animal seja responsável pelo desenvolvimento de GECF, devido a uma resposta hiperativa ou por disfunção nos mecanismos de defesa (Henet, 1997). Apesar de não ter sido provada, a teoria da GECF ser causada por uma resposta imunitária anormal à microbiota oral é frequentemente aceite. A infecção viral pode contribuir ao conduzir a uma perda de tolerância à microbiota oral em indivíduos geneticamente suscetíveis. Os potenciais mecanismos através dos quais os vírus podem atuar neste sentido incluem alteração da microbiota oral ou do padrão de expressão das citocinas do animal, indução de reatividade cruzada da resposta imunitária viral para as bactérias da cavidade oral ou lesão das mucosas, aumentando a exposição das células do sistema imunitário às bactérias (Stickney, 2018).

A análise histopatológica das biópsias orais colhidos dos gatos com GECF revelou resultados muito homogêneos e semelhantes entre todos os animais., sendo que a maioria das lâminas obtiveram a classificação de grau 3 de gravidade segundo a classificação proposta por Harley et al. (2011) Foram descritas extensas áreas de degeneração epitelial, espongiose e ulceração e exsudação superficial com numerosos linfócitos, macrófagos e neutrófilos. A infiltração exuberante por células inflamatórias, como linfócitos, plasmócitos, macrófagos, neutrófilos e células de Mott localizou-se maioritariamente na lâmina própria/submucosa. As células de Mott são frequentemente observadas em situações de doenças autoimunes, infeções crónicas, leucemia, mieloma múltiplo e gamopatias monoclonais (Ravath, Kulkarni & Vinod, 2017). Na opinião de Cotter (2015), estas células indicam uma resposta imunitária aberrante.

Através da radiografia dentária, observou-se que tanto 90% dos animais com GECF como 90% dos animais saudáveis apresentavam lesões de RD. Este valor é superior ao descrito na literatura

em que estão descritas prevalências de RD em 49% de animais com GECF (Farcas et al., 2014). A maior prevalência encontrada neste estudo pode ser atribuída ao acaso dada a pequena dimensão da amostra de animais.

Todos os animais do presente estudo foram submetidos a extrações dentárias como opção terapêutica. Desta amostra, 50% (5 animais) obtiveram sucesso terapêutico e destes 40% (2 animais) alcançaram resolução completa. Os restantes 50% beneficiaram pouco do tratamento cirúrgico. Dois estudos prévios relatam resultados muito semelhantes entre si, com 80% dos animais a alcançarem sucesso terapêutico, sendo que 60% destes obtiveram a cura clínica (Hennet, 1997; Bellei et al., 2008). Outro estudo mais recente, de cariz retrospectivo, mostra um número inferior de gatos a recuperar com sucesso (67,4%), dos quais 28,4% recuperaram completamente (Jennings et al., 2015). O menor sucesso obtido neste estudo pode dever-se à pequena amostra de animais. Estes resultados demonstram a baixa eficácia do tratamento cirúrgico como tratamento único na GECF, existindo 20 a 50% de animais que não beneficiam com esta opção terapêutica. Deste modo ressalta a importância da combinação com tratamentos farmacológicos no manejo de casos refratários, não havendo ainda um consenso relativamente a qual o melhor tipo de terapêutica (Hennet et al., 2011; Lommer, 2013; Jennings et al., 2015).

Relativamente aos sinais clínicos, antes da intervenção cirúrgica, a maioria dos animais apresentava sinais clínicos graves, pontuados maioritariamente com 2 e 3 na classificação de 0 a 3. Aos 60 dias pós tratamento observou-se uma diminuição das classificações nos quatro parâmetros avaliados (apetite, nível de atividade, higiene e conforto), o que reflete uma melhoria dos sinais clínicos avaliados. No entanto, apenas nos fatores limpeza/higiene e conforto foram verificadas diferenças estatísticas significativas. Todos os animais apresentavam lesões de estomatite caudal e bucoestomatite graves previamente ao tratamento. Em 2017, Druet & Hennet não encontraram relação entre a gravidade das lesões de estomatite caudal e o tempo necessário para atingir melhorias significativas ou a cura clínica. No presente estudo também não foi encontrada correlação entre estes dois fatores, possivelmente pela reduzida amostra de animais, apesar da área e a gravidade da inflamação terem diminuído após o tratamento cirúrgico.

A média de valores de SAA obtidos no grupo controlo é ligeiramente inferior ao relatado na literatura. No presente estudo este valor foi de $0,1004 \pm 0,178$ µg/ml, enquanto em estudos anteriores foram observados valores médios de 16,6 µg/ml (Kajikawa et al., 1999), 0,6 µg/ml (Sasaki et al., 2003), 10,21 µg/ml (Giordano et al., 2004) e 1,8 µg/ml (Kann et al., 2012). Estas disparidades podem dever-se às diferentes metodologias usadas para o doseamento da proteína.

No grupo de casos, a média de valores de SAA foi de $3,9885 \pm 1,377$ µg/ml. Estudos anteriores descrevem valores de 150,1 µg/ml (Kajikawa et al., 1999), 33,65 µg/ml (Sasaki et al., 2003), 82,88 µg/ml (Giordano et al., 2004) e 16,0 µg/ml (Kann et al., 2012) em gatos com diferentes doenças. Contudo, estes valores não traduzem a verdadeira concentração das amostras, uma vez que 9 das amostras muito provavelmente apresentavam medições com valores superiores ao intervalo de absorvância (0-4) lida pelo espectrofotômetro no comprimento de onda selecionado (450 nm). De modo a obter-se valores mais fidedignos, deveria ter-se repetido o ensaio laboratorial e usar uma maior diluição para as amostras séricas. Devido ao número limitado de poços da placa de leitura e à indisponibilidade financeira para aquisição de outra placa, não foi possível repetir o ensaio com as diluições necessárias.

Os níveis séricos de SAA já foram doseados em gatos com diversas doenças, porém, não existe nenhum estudo que reporte os níveis desta PFA em gatos com doença oral. Dois estudos recentes demonstraram que gatos com GECF apresentam valores superiores de haptoglobina e AGP relativamente a animais saudáveis (Polkowska et al., 2018; Rosa, 2018). Estes resultados são concordantes com os obtidos no presente estudo em que foram encontradas diferenças estatísticas significativas ($p < 0,0001$) entre as médias da concentração sérica de SAA do grupo controle ($0,1004 \pm 0,178$ µg/ml, IC 95%) e do grupo de estudo ($3,9885 \pm 1,377$ µg/ml, IC 95%). Os valores máximos obtidos foram de 4,424 µg/ml. Os níveis séricos de SAA foram cerca de trinta e nove vezes superiores nos animais com GECF relativamente aos animais saudáveis, reforçando assim a ideia de que existe um estado inflamatório sistémico associado à GECF.

O comportamento da SAA após o tratamento cirúrgico foi investigado. A diminuição da concentração de SAA entre o dia 0 e o dia 60 apenas aconteceu em 3 dos animais doentes. Apesar de nestes casos a diminuição ter sido de grande magnitude, não foram encontradas diferenças estatísticas significativas entre a concentração sérica de SAA no dia 0 e no dia 60 neste conjunto de animais ($p = 0,141$). Porém, muitas das amostras dos casos apresentavam medições com valores superiores ao intervalo de absorvância (0-4) lida pelo espectrofotômetro no comprimento de onda selecionado (450 nm), não sendo possível obter uma concentração real das mesmas. É possível que mais animais tenham sofrido uma diminuição nos valores séricos de SAA mas, como estes valores foram superiores ao intervalo de absorvância lido, não os conseguimos quantificar. No estudo de Rosa (2018) a resposta não foi consistente em todos os casos. A heterogeneidade no comportamento desta PFA após o tratamento reflete a falta de eficácia das

exodontias como medida terapêutica única, uma vez que em grande parte dos animais não houve uma diminuição na sua concentração.

Apesar da diminuição da gravidade das lesões e dos sinais clínicos nos 60 dias pós tratamento, não foram encontradas correlações entre estes parâmetros e o valor sérico de SAA no primeiro e último tempo estudado. Do mesmo modo, não foi encontrada uma correlação significativa entre a EDT e a média de SAA sérica nestes dois períodos de tempo. Porém, a pequena amostra utilizada condiciona o baixo poder estatístico desta análise.

Apesar do tratamento cirúrgico ser atualmente a abordagem terapêutica privilegiada no tratamento da GECF, vários autores já referenciaram que alguns animais são refratários a esta medida terapêutica (Bellei et al., 2008; Jennings et al., 2015). Analisando a EDT e a persistência de valores elevados de SAA na maioria dos animais da amostra deste estudo, podemos concluir que estes gatos são refratários ao tratamento instituído. Todos os animais do grupo casos apresentavam lesões graves de estomatite caudal e bucoestomatite paralelamente à infecção por FCV. Apesar da eficácia do tratamento ter sido de 50%, apenas um terço da amostra revelou uma diminuição na concentração sérica de SAA nos 60 dias pós tratamento. Podemos afirmar que, do ponto de vista sistêmico, o estado inflamatório destes animais não foi revertido. É possível que nestes animais a inflamação não esteja limitada à cavidade oral e que a GECF esteja acompanhada de uma componente inflamatória sistêmica, sendo necessária uma abordagem terapêutica distinta.

5. Conclusões

A concentração sanguínea das proteínas de fase aguda altera-se rapidamente em resposta a lesões tecidulares e infecções. No caso do gato, a SAA é uma das proteínas de fase aguda mais utilizadas e pensa-se que pode ser útil como marcador inflamatório (Tamamoto, Ohno, Ohmi, Seki & Tsujimoto, 2009). Este estudo confirma que a concentração sérica de SAA está significativamente aumentada em animais com GECF. Estudos anteriores já tinham relatado aumentos na concentração sérica de SAA em gatos com diversas doenças mas nunca em animais com GECF (Kajikawa, 1999; Tamamoto et al., 2009; Kann et al., 2012; Tamamoto et al., 2013; Troia et al., 2017).

Foi também avaliada a possibilidade do uso da SAA como marcador de prognóstico ao dosear-se esta proteína antes do tratamento e 30 e 60 dias após o mesmo. Nos estudos de Tamamoto et al. (2009; 2013), a concentração sérica de SAA relacionou-se com o desenvolvimento ao longo do tempo de várias doenças e os autores sugeriram que esta PFA tem utilidade como indicador de

prognóstico. No presente estudo não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre as concentrações de SAA aos dias 0 e 60, podendo apenas realçar-se que só em 3/10 dos animais se verificou uma diminuição dessa concentração.

Não foram encontradas diferenças nem correlações estatisticamente significativas entre a concentração de SAA nos três tempos avaliados e a EDT ou os graus de gravidade das lesões avaliadas, a não ser entre a concentração de SAA e o grau de bucoestomatite ($p=0,008$) e a área total de lesão ($p=0,022$) no dia 30. Deste modo, com esta amostra, não podemos concluir que animais com lesões mais graves tenham valores mais elevados de SAA, nem podemos extrapolar os valores de SAA no primeiro tempo (dia 0) para o possível sucesso ou insucesso do tratamento. A necessidade de mais investigação clínica na GECF revela-se crucial, com ênfase na descoberta de biomarcadores de monitorização da doença e na padronização de protocolos terapêuticos médicos e cirúrgicos de modo a aumentar os números de sucesso no tratamento destes animais.

6. Limitações do estudo

O presente estudo teve limitações intrínsecas aos animais constituintes da amostra e na técnica de doseamento escolhida para o doseamento da SAA. Relativamente às limitações intrínsecas do estudo, realça-se a reduzida dimensão da amostra, o que contribui para um menor poder estatístico. Paralelamente, ao invés que a totalidade dos animais doentes estavam infetados pelo FCV, todos os animais controlo eram negativos à infeção por este agente patogénico. Deste modo, não sabemos até que ponto é que a infeção pelo FCV pode influenciar os valores séricos de SAA.

As limitações técnicas prenderam-se maioritariamente com as restrições financeiras do estudo que permitiram apenas a aquisição de uma placa de ELISA para o doseamento de SAA. O número limitado de poços da placa torna impossível a re-testagem de amostras em casos de necessidade de maior diluição. Grande parte das amostras provenientes dos animais do grupo casos apresentaram valores superiores ao intervalo de absorvância (0-4) lido pelo espectrofotómetro no comprimento de onda selecionado (450 nm). Caso a repetição do ensaio fosse possível, teria sido utilizada uma maior diluição das amostras e os valores de absorvância seriam esclarecidos. Deste modo seria possível observar os valores reais de SAA nestes animais e, provavelmente, tirar mais conclusões desta análise.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Afonso, M., Pinchbeck, G., Smith, S., Daly, J., Gaskell, R., Dawson, S. & Radford, A. (2017). A multi-national European cross-sectional study of feline calicivirus epidemiology, diversity and vaccine cross-reactivity. *Vaccine*, 35, 2753-2760.

Arzi, B., Clark, K. C., Sundaram, A., Spriet, M., Verstraete, M., Walker, N., Loscar, M., Fazel, N., Murphy, W., Vapniarsky, N. & Borjesson, D. (2017). Therapeutic efficacy of fresh, allogeneic mesenchymal stem cells for severe refractory feline chronic gingivostomatitis. *Stem Cells Translational Medicine*, 6, 1710-1722.

Arzi, B., Mills-Ko, E., Verstraete, F., Kol, A., Walker, N., Badgley, M., Fazel, N., Murphy, W., Vapniarsky, N. & Borjesson, D. (2015). Therapeutic Efficacy of Fresh, Autologous Mesenchymal Stem Cells for Severe Refractory Gingivostomatitis in Cats. *Stem Cells Translational Medicine*, 5, 75-86.

Arzi, B., Murphy, B., Cox, D., Vapniarsky, N., Kass, P. & Verstraete, F. (2010). Presence and quantification of mast cells in the gingiva of cats with tooth resorption , periodontitis and chronic stomatitis. *Archive of Oral Biology*, 55, 148–154.

Ballou, S., Lozanski, G., Hodder, S., Rzewnicki, D., Mion, L., Sipe, J., Ford, A., Kushner, I. (1996). Quantitative and Qualitative Alterations of Acute-phase Proteins in Healthy Elderly Persons. *Age and Ageing*, 25, 224–230.

Bellei, E., Dalla, F., Masetti, L., Pisoni, L. & Joechler, M. (2008). Surgical therapy in chronic feline gingivostomatitis (FCGS). In *Veterinary Research Communications*, 32, 231-234.

Bellows, J. (2013). Laser and Radiosurgery in Veterinary Dentistry. *The Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, 43, 652-668.

Bellows, J., Carithiers, D. & Gross, S. (2012). Efficacy of a Barrier Gel for Reducing the Development of Plaque, Calculus and Gingivitis in Cats. *Journal of Veterinary Dentistry*, 29, 89-94.

Belgard, S., Truyen, U., Thibault, J., Sauter-Louis, C. & Hartmann, K. (2010). Relevance of feline calicivirus, feline immunodeficiency, feline leukemia virus, feline herpesvirus and Bartonella henselae in cats with chronic gingivostomatitis. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr*, 123, 369-376.

Bonello, D. (2007). Feline Inflammatory, Infectious and Other Oral Conditions. In *Bsava Manual of Canine and Feline Dentistry* (3^a ed.) (pp. 126-147). Gloucester: British Small Animal Veterinary Association

Callahan, G. & Yates, R. (2014). Veterinary Clinical Laboratory Immunology. In Warren, A. *Basic Veterinary Immunology* (pp. 295-317). Boulder, Colorado: University Press of Colorado.

Cannon, M. (2015). Feline chronic gingivostomatitis. *Companion Animal*, 20, 616–623.

Céron, J., Eckersall, P., Martinez-Subiela, S. (2005). Acute Phase Proteins in Dogs and Cats: Current Knowledge and Future Perspectives. *Veterinary Clinical Pathology*, 34, 85-99.

Christoffersen, B., Jensen, S., Ludvigsen, T., Nilsson, S., Grossi, A. & Heegaard, P. (2015). Age- and Sex-Associated Effects on Acute-Phase Proteins in Göttingen Minipigs. *Comparative Medicine*, 65, 333–341.

Cray, C., Zaias, J. & Altman, N. (2009). Acute Phase Response in Animals : A Review, 59, 517–526.

Diehl, K. & Rosychuk, R. (1993). Feline gingivitis - Stomatitis-pharyngitis. *Veterinary Clinics of North America - Small Animal Practice*, 59, 517-526.

Dolieslager, S., Lappin, D., Bennett, D., Graham, L., Johnston, N. & Riggio, M. (2013). The influence of oral bacteria on tissue levels of Toll-like receptor and cytokine mRNAs in feline chronic gingivostomatitis and oral health. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 151, 263-274.

Dolieslager, S., Riggio, M., Lennon, A., Lappin, D., Johnston, N., Taylor, D. & Bennett, D. (2011). Identification of bacteria associated with feline chronic gingivostomatitis using culture-dependent and culture-independent methods. *Veterinary Microbiology*, 148, 93-98.

Dowers, K., Hawley, J., Brewer, M., Morris, A., Radecki, S. & Lappin, M. (2010). Association of Bartonella species, feline calicivirus, and feline herpesvirus 1 infection with gingivostomatitis in cats. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, 12, 314-321.

Eckersall, P. (2008). Proteins , Proteomics , and the Dysproteinemias. In Kaneko, J., Harvey, J. & Bruss, M. *Clinical Biochemistry of Domestic Animals* (6th ed.) (pp 117-155).

Eckersall, P. & Bell, R. (2010). Acute phase proteins: Biomarkers of infection and inflammation in veterinary medicine. *Veterinary Journal*, 185, 23–27.

Ehmann, R., Kristen-Burmann, C., Bank-Wolf, B., König, M., Herden, C., Hain, T., Thiel, H., & Ziebuhr, J. (2018). Reverse Genetics for Type I Feline Coronavirus Field Isolate To Study the Molecular Pathogenesis of Feline Infectious Peritonitis. *mBio*, 9, 1–17.

Farcas, N., Lommer, M., Kass, P., Verstraete, F. (2014). Dental radiographic finding in cats with chronic gingivostomatitis (2002-2012). *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 244, 339-345.

Fernandez, M., Manzanilla, E., Lloret, A., León, M. & Thibault, J. (2017). Prevalence of feline herpesvirus-1, feline calicivirus, Chlamydomphila felis and Mycoplasma felis DNA and associated risk factors in cats in Spain with upper respiratory tract disease, conjunctivitis and/or gingivostomatitis. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, 19, 461-469.

Glaus, T., Greene, C., Glaus, B. & Wolfensberger, C. (1997). Seroprevalence of Bartonella henselae Infection and Correlation with Disease Status in Cats in Switzerland. *Journal of Clinical*

Microbiology, 35, 2883–2885.

Gollaher, C. & Bausserman, L. (1990). Hepatic Catabolism of Serum Amyloid A during an Acute Phase Response and Chronic Inflammation. *Experimental Biology and Medicine*, 194, 245–250.

Greenfield, B. (2017). Chronic Feline Gingivostomatitis: Proven Therapeutic Approaches & New Treatment Options. *Today's Veterinary Practice*, 7, 27–38.

Harley, R., Gruffydd-Jones, T. & Day, M. (2003). Salivary and serum immunoglobulin levels in cats with chronic gingivostomatitis. *Veterinary Record*, 152, 125–129.

Harley, R., Gruffydd-Jones, T. & Day, M. (2011). Immunohistochemical Characterization of Oral Mucosal Lesions in Cats with Chronic Gingivostomatitis. *Journal of Comparative Pathology*, 144, 239–250.

Harley, R., Helps, C., Harbour, D., Gruffydd-Jones, T. & Day, M. (1999). Cytokine mRNA Expression in Lesions in Cats with Chronic Gingivostomatitis. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 6, 471–478.

Healey, K., Dawson, S., Burrow, R., Cripps, P., Gaskell, C., Hart, C., Pinchbeck, G., Radford, A. & Gaskell, R. (2007). Prevalence of feline chronic gingivo-stomatitis in first opinion veterinary practice. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, 9, 373–381.

Hennet, P. (2017). Chronic gingivo-stomatitis in cats: Long-term follow-Up of 30 cases treated by dental extractions. *Journal of Veterinary Dentistry*, 14, 15–21.

Hennet, P., Camy, G., McGahie, D. & Albouy, M. (2011). Comparative efficacy of a recombinant feline interferon omega in refractory cases of calicivirus-positive cats with caudal stomatitis: A randomised, multi-centre, controlled, double-blind study in 39 cats. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, 13, 577–587.

Hirschberg, A. (1998). Hormonal regulation of appetite and food intake. *Annals of Medicine*, 30, 7–20.

Jennings, M., Lewis, J., Soltero-Rivera, M., Brown, D. & Reiter, A. (2015). Effect of tooth extraction on stomatitis in cats: 95 cases (2000–2013). *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 246, 654–660.

Kajikawa, T., Furuta, A., Onishi, T., Tajima, T. & Sugii, S. (1999). Changes in concentrations of serum amyloid a protein, α 1-acid glycoprotein, haptoglobin, and C-reactive protein in feline sera due to induced inflammation and surgery. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 68, 91–98.

Kann, R., Seddon, J., Henning, J. & Meers, J. (2012). Acute phase proteins in healthy and sick cats. *Research in Veterinary Science*, 93, 649–654.

Knowles, J., Gaskell, R., Gaskell, C., Harvey, C., Lutz, H. (1989). Prevalence of feline

calicivirus, feline leukaemia virus and antibodies to FIV in cats with chronic stomatitis. *The Veterinary Record*, 124, 336-338.

Johnston, N. (2012). An updated approach to chronic feline gingivitis stomatitis syndrome. *Veterinary Practice*, 44, 34-38.

Kann, R., Seddon, J., Henning, J. & Meers, J. (2012). Acute phase proteins in healthy and sick cats. *Research in Veterinary Science*, 93, 649–654.

Kisilevsky, R., Manley, P., Kisilevsky, R., & Manley, P. (2012). Acute-phase serum amyloid A : Perspectives on its physiological and pathological roles. *The Journal of Protein Folding Disorders*, 19, 5-14.

Kjelgaard-Hansen, M. & Jacobsen, S. (2011). Assay Validation and Diagnostic Applications of Major Acute-phase Protein Testing in Companion Animals. *Clinics in Laboratory Medicine*, 31, 51–70.

Leal, R. & Gil, S. (2016). The Use of Recombinant Feline Interferon Omega Therapy as an Immune-Modulator in Cats Naturally Infected with Feline Immunodeficiency Virus: New Perspectives. *Veterinary Sciences*, 3, 32.

Leal, R., Gil, S., Brito, M., McGahie, D., Niza, M. & Tavares, L. (2013). The use of oral recombinant feline interferon omega in two cats with type II diabetes mellitus and concurrent feline chronic gingivostomatitis syndrome. *Irish Veterinary Journal*, 66, 19.

Lewis, J., Tsugawa, A., Reiter, A. & Tzt, D. (2007). Use of CO2 laser as an adjunctive treatment for caudal stomatitis in a cat. *Journal of Veterinary Dentistry*, 24, 240-249.

Li, S., Zhao, F., Shao, J., Xie, Y., Chang, H. & Zhang, Y. (2017). Interferon-omega: Current status in clinical applications. *International Immunopharmacology*, 52, 253-260

Lommer, M. (2013a). Efficacy of Cyclosporine for Chronic, Refractory Stomatitis in Cats: A Randomized, Placebo-Controlled, Double-Blinded Clinical Study. *Journal of Veterinary Dentistry*, 30, 8-17.

Lommer, M. (2013b). Oral Inflammation in Small Animals. *Veterinary Clinics of North America - Small Animal Practice*, 43, 555-571.

Lyon, K. (2005). Gingivostomatitis. *Veterinary Clinics of North America - Small Animal Practice*, 35, 891-911.

Mestrinho, L., Castéjon., Gordo, I., Serrano, M., Requicha, J., Velázquez, I. & Niza, M., (2015). Tratamento. In *Estomatologia do Gato* (1ª ed.) (pp. 69-86). Lisboa: Lisboa.

MacLachlan, N. & Dubovi, E. (2017). Caliciviridae and Astroviridae. In *Fenner's Veterinary Virology* (5th ed.) (pp. 505-506). London, UK: Elsevier.

Mihaljevic, S. (2003). First clinical experiences with omega-Interferon in the treatment of chronic gingivitis-stomatitis-oropharyngitis of cats. *Der Praktische Tierarzt*, 84, 350-361.

Milella, L., Beckman, B. & Kane, J. S. (2014). Evaluation of an Anti-Plaque Gel for Daily Toothbrushing. *Journal of Veterinary Dentistry*, 31, 160-167.

Möstl, K., Egberink, H., Addie, D., Frymus, T., Boucraut-baralon, C., Truyen, U., Hartmann, K., Lutz, H., Gruffydd-Jones, T., Radford, A., Lloret, A., Pennisi, M., Hosie, M., Marsilio, F., Thiry, E., Belák, S. & Horzinek, M. (2013). Prevention of Infectious Diseases in Cat Shelters ABCD guidelines. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, 15, 546-554.

Nakanishi, H., Furuya, M., Soma, T., Hayashiuchi, Y., Yoshiuchi, R., Matsubayashi, M., Tani, H & Sasai, K. (2018). Prevalence of microorganisms associated with feline gingivostomatitis. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, 21, 103-108.

Niemiec, B. (2008). Periodontal disease. *Topics in Companion Animal Medicine*, 23, 72-80

Niemiec, B. (2012). Gingivostomatitis (caudal stomatitis) in cats. In *Small Animal Dental, Oral and Maxillofacial Disease*. London, UK: Manson Publishing.

Niza, M., Mestrinho, L. & Vilela, C. L. (2004). Gengivo-estomatite crónica felina - um desafio clínico. *Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias*, 99, 127-135.

Oliveira, J. R. A. D. (2017). Avaliação Retrospectiva do Tratamento De Gengivoestomatite Crónica Felina Em 80 Casos Clínicos. Dissertação de Mestrado Integrado De Medicina Veterinária. Lisboa: Faculdade de Medicina Veterinária - Universidade de Lisboa.

Paltrinieri, S. (2008). The feline acute phase reaction. *Veterinary Journal*, 177, 26-35.

Pesavento, P., Chang, K. & Parker, J. (2008). Molecular Virology of Feline Calicivirus. *Veterinary Clinics of North America - Small Animal Practice*, 38, 775-786.

Polkowska, I., Gołyńska, M., Sobczyńska-Rak, A., Dudek, A., Szponder, T., Żylińska, B. & Matuszewski, Ł. (2018.). Haptoglobin as a treatment monitoring factor in feline plasmacytic gingivostomatitis. *Polish Journal of Veterinary Sciences*, 21, 167-174.

Poulet, H., Brunet, S., Soulier, M., Leroy, V., Goutebroze, S. & Chappuis, G. (2000). Comparison between acute oral / respiratory and chronic stomatitis / gingivitis isolates of feline calicivirus: pathogenicity, antigenic profile and cross-neutralisation studies. *Archives of Virology*, 145, 243-261.

Quimby, J. & Borjesson, D. (2018). Mesenchymal stem cell therapy in cats: Current knowledge and future potential. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, 20, 208-216.

Quimby, J., Elston, T., Hawley, J., Brewer, M., Miller, A. & Lappin, M. (2008). Evaluation of the association of Bartonella species, feline herpesvirus 1, feline calicivirus, feline leukemia virus and feline immunodeficiency virus with chronic feline gingivostomatitis. *Journal of Feline*

Medicine and Surgery, 10, 66-72.

Radford, A., Dawson, S., Coyne, K., Porter, C. & Gaskell, R. (2006). The challenge for the next generation of feline calicivirus vaccines. *Veterinary Microbiology*, 117, 14-18.

Radford, A., Addie, D., Blák, S., Boucraut-Baralon, C., Egberink, H., Frymus, T., Gruffydd-Jones, T., Hartmann, B., Hosie, M., Lloret, A., Lutz, H., Marsilio, F., Pennisi, M., Thiry, E., Truyen, U. & Horzinek, M. (2009). Feline Calicivirus Infection: ABCD guidelines on Prevention and Management. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, 11, 556-564.

Reubel, G. Hoffmann, D. & Pedersen, N. (1992) Acute and Chronic Fautitis of Domestic Cats: A Feline Calicivirus-Induced Disease. *Feline Dentistry*, 22, 1347-1360.

Rolim, V., Pavarini, S., Campos, F., Pignone, V., Faraco, C., Muccillo, M., Roehe, P., Costa, F. & Driemeier, D. (2017). Clinical, pathological, immunohistochemical and molecular characterization of feline chronic gingivostomatitis. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, 19, 403-409.

Rosa, R. (2018). O Papel da Alfa-1 Glicoproteína Ácida na Monitorização Clínica da Gengivoestomatite Crónica no Gato: Um Estudo Exploratório. Dissertação de Mestrado Integrado De Medicina Veterinária. Lisboa: Faculdade de Medicina Veterinária - Universidade de Lisboa.

Sack, G., (2018). Serum amyloid A – a review. *Molecular Medicine*, 24, 1–27.

Santos, B., Requicha, J., Pires, M. & Viegas, C. (2016). Complexo Gengivite-Estomatite-Faringite Felino: A Doença e o Diagnóstico. *Revista Lusófona de Ciência e Medicina Veterinária*, 8, 18-27.

Sasaki, K., Ma, Z., Khatlani, T., Okuda, M., Inokuma, H. & Onishi, T. (2003). Evaluation of Feline Serum Amyloid A (SAA) as an Inflammatory Marker. *The Journal of Veterinary Medical Science*, 65, 545–548.

Sims, T., Moncla, B. & Page, R. (1990). Serum Antibody Response to Antigens of Oral Gram-negative Bacteria by Cats with Plasma Cell Gingivitis-Pharyngitis. *Journal of Dental Research*, 69, 877-882.

Southerden, P. (2010). Review of Feline oral disease 1. Periodontitis and chronic gingivostomatitis. *In Practice*, 32, 2-7.

Southerden, P. & Gorrel, C. (2007). Treatment of a case of refractory feline chronic gingivostomatitis with feline recombinant interferon omega. *Journal of Small Animal Practice*, 48, 104-106.

Steagall, P., Monteiro-Steagall, B. & Taylor, P. (2014). A review of the studies using buprenorphine in cats. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 28, 762–770.

Tamamoto, T., Ohno, K., Ohmi, A., Seki, I., & Tsujimoto, H. (2009). Time-course

monitoring of serum amyloid A in a cat with pancreatitis. *Veterinary Clinical Pathology*, 38, 83–86.

Tamamoto, T., Ohno, K., Takahashi, M., Nakashima, K., Fujino, Y., & Tsujimoto, H. (2013). Serum amyloid A as a prognostic marker in cats with various diseases. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 25, 428–432.

Tataranni, P., Larson, D., Snitker, W., Young, J., Flatt, J. & Ravussin, E. (2018). Effects of glucocorticoids on energy metabolism and food intake in humans. *The American Journal of Physiology*, 217, 317-325.

Thompson, R., Wilcox, G., Clark, W. & Jansen, K. (1984). Association of calicivirus infection with chronic gingivitis and pharyngitis in cats. *Journal of Small Animal Practice*, 25, 207-210.

Tizard, I. (2013). Drugs and Other Agents That Affect the Immune System. In *Veterinary Immunology* (9^a ed.). (pp-467-469). St Louis, Missouri: Saunders, Elsevier.

Tizard, I. (2013a). Systemic Responses to Inflammation. In *Veterinary Immunology* (9^a ed.). (pp-467-469). St Louis, Missouri: Saunders, Elsevier.

Tizard, I., (2013b). Immunodiagnostic Techniques. In *Veterinary Immunology* (9^a ed.). (pp-467-469). St Louis, Missouri: Saunders, Elsevier.

Troia, R., Gruarin, M., Foglia, A., Agnoli, C., Dondi, F. & Giunti, M. (2017). Serum amyloid A in the diagnosis of feline sepsis. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 29, 856–859.

Ueno, H., Hohdatsu, T., Muramatsu, Y., Koyama, H., Morita, C. (1996). Does Coinfection of *Bartonella henselae* Induce Clinical Disorders in Cats ?. *Microbiology and Immunology*, 40, 617–620.

Uhlar, C. & Whitehead, A. (1999). Serum amyloid A , the major vertebrate acute-phase reactant. *European Journal of Biochemistry*, 265, 521-523.

MacIachlan, N. & Dubovi, E. (2017). Caliciviridae and Astroviridae. In *Fenner's Veterinary Virology* (5^a ed.) (pp 497-510). London, United Kingdom: Academic Press.

Williams, C. & Aller, M. (1992). Gingivitis/stomatitis in cats. *The Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, 22, 1361-1383.

Winer, J., Arzi, B. & Verstraete, F. (2016). Therapeutic Management of Feline Chronic Gingivostomatitis: A Systematic Review of the Literature. *Frontiers in Veterinary Science*, 3, 54.

Wray, D., Rees, S., Gibson, J. & Forsyth, A. (2000). The role of allergy in oral mucosal diseases. *Monthly Journal of the Association of Physicians*, 93, 507–511.

Ye, R. & Sun, L. (2015). Emerging functions of serum amyloid A in inflammation. *Journal of Leukocyte Biology*, 98, 923-929.

Anexo I - Questionário realizado aos tutores.

Questionário

“O papel da proteína amilóide sérica A na monitorização clínica da gengivoestomatite crónica no gato”

- 1- O seu gato vive dentro de casa/tem acesso à rua? Foi resgatado da rua?
- 2- O seu gato é vacinado? Se sim, com que vacina e quando foi a última administração?
- 3- O seu gato tem outra doença diagnosticada?
- 4- Há quanto tempo o seu gato foi diagnosticado com GECF?
- 5- Quais foram os sinais clínicos que o alertou para a doença?
- 6- Que tratamentos foram tentados antes da cirurgia?
- 7- Notou melhorias após as extrações dentárias? Se sim, em que sentido.

Obrigada pela sua participação.

Anexo II - Sistema de avaliação dos sinais clínicos, classificando o grau de apetite, nível de atividade, limpeza e higiene assim como do conforto. O questionário foi realizado ao dia 0, 30 e 60. Com os resultados conseguimos classificar a EDT.

Questionário aos Donos			
Paciente		Data	__/__/2016
Raça		Dono	
Idade		Contacto	
Peso		Morada	
Dieta			

Avaliação do Cliente: Coloque um círculo no número que corresponde ao critério que mais se adequa ao seu gato.

Apetite

0	Come normalmente.
1	Come comida húmida e seca, mas em quantidade inferior ao normal.
2	Come comida húmida sozinho e não come comida seca.
3	Só come comida húmida e apenas quando lha oferece à mão.

Nível de Actividade

0	Actividade normal - brincalhão e activo.
1	Brinca espontaneamente mas não frequentemente.
2	Pouco activo - Brinca ocasionalmente quando estimulado por pessoas ou outros animais
3	Não se interessa por pessoas ou outros animais, passa a maior parte do tempo a dormir.

Limpeza e Higiene

0	Faz a sua limpeza e higiene normalmente.
1	Faz a sua limpeza e higiene de um modo excessivo.
2	Faz a sua limpeza e higiene ocasionalmente como não antes.
3	Não faz a sua limpeza e higiene.

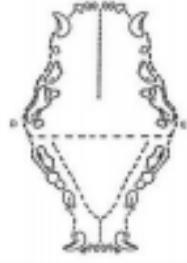
Percepção do Nível de Conforto:

Numa escala de 0-3, sendo 0 o mais confortável e 3 o mais doloroso, classifique o grau de conforto do seu gato:

0 1 2 3

Obrigado pela sua colaboração.

Anexo III- Sistema de avaliação das lesões, classificando o grau de estomatite, de mucosite e a área total das lesões.

Sistema de Avaliação das lesões																															
<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr><td>Paciente</td><td></td></tr> <tr><td>Raça</td><td></td></tr> <tr><td>Idade</td><td></td></tr> <tr><td>Sexo</td><td></td></tr> <tr><td>Dieta</td><td></td></tr> </table>				Paciente		Raça		Idade		Sexo		Dieta		<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr><td>Data</td><td colspan="2">___/___/2018</td></tr> <tr><td>Onde</td><td colspan="2"></td></tr> <tr><td>Contacto</td><td colspan="2"></td></tr> <tr><td>Morada</td><td colspan="2"></td></tr> </table>						Data	___/___/2018		Onde			Contacto			Morada		
Paciente																															
Raça																															
Idade																															
Sexo																															
Dieta																															
Data	___/___/2018																														
Onde																															
Contacto																															
Morada																															
Nota: O veterinário tem de atribuir a pontuação adequada de acordo com a intensidade da lesão inflamatória em cada quadrante, separadamente. Coloque um círculo no número que corresponde ao critério que mais se adequa em cada quadrante.																															
Grau da Estomatite Caudal																															
MNE	MND	MLE	MLD	Descrição																											
0	0	0	0	Ausência de lesão																											
1	1	1	1	Inflamação ligeira, não ulcerativa, não proliferativa, não sangra espontaneamente, não sangra quando aplicada um ligeira pressão.																											
2	2	2	2	Inflamação moderada, não ulcerativa, não ou ligeiramente proliferativa, não sangra espontaneamente, não sangra quando aplicada um ligeira pressão.																											
3	3	3	3	Inflamação moderada, ulcerativa ou ulcero-proliferativa, não sangra espontaneamente, mas sangra quando aplicada um ligeira pressão.																											
4	4	4	4	Inflamação grave, ulcerativa ou ulcero-proliferativa, sangra espontaneamente.																											
Grau da Mucosite Alveolar/Bucal																															
MNE	MND	MLE	MLD	Descrição																											
0	0	0	0	Ausência de lesão																											
1	1	1	1	Inflamação ligeira, não ulcerativa, não proliferativa, não sangra espontaneamente, não sangra quando aplicada um ligeira pressão.																											
2	2	2	2	Inflamação moderada, não ulcerativa, não ou ligeiramente proliferativa, não sangra espontaneamente, não sangra quando aplicada um ligeira pressão.																											
3	3	3	3	Inflamação moderada, ulcerativa ou ulcero-proliferativa, não sangra espontaneamente, mas sangra quando aplicada um ligeira pressão.																											
4	4	4	4	Inflamação grave, ulcerativa ou ulcero-proliferativa, sangra espontaneamente.																											
Área Total das Lesões																															
		Descrição		Localização das Lesões 																											
0	Ausência de área de lesão																														
1	Área total de 0 até 0,5 cm ²																														
2	Área total de 0,5 até 1 cm ²																														
3	Área total de 1 até 2 cm ²																														
4	Área total de 2 até 3 cm ²																														
5	Área total de 3 até 4 cm ²																														
6	Área total > 4 cm ²																														
<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr><td>MNE</td><td>Mandíbula Esquerda</td></tr> <tr><td>MND</td><td>Mandíbula Direita</td></tr> <tr><td>MLE</td><td>Maxilar Esquerdo</td></tr> <tr><td>MLD</td><td>Maxilar Direito</td></tr> </table>		MNE	Mandíbula Esquerda	MND	Mandíbula Direita	MLE	Maxilar Esquerdo	MLD	Maxilar Direito	Obrigado pela sua colaboração.																					
MNE	Mandíbula Esquerda																														
MND	Mandíbula Direita																														
MLE	Maxilar Esquerdo																														
MLD	Maxilar Direito																														

Anexo IV – Descrição do grupo controlo (C) com base na raça, sexo, idade (anos) e peso (kg).

Grupo controlo				
Gato	Raça	Sexo	Idade (anos)	Peso (kg)
1C: Kit	Europeu comum	Macho	0,5	4
2C: Koshka	Europeu comum	Fêmea	6	3,8
3C: Nini	Europeu comum	Fêmea	11	3,5
4C: Jubas	Bosques da Noruega	Macho	6	5,3
5C: Dexter	Ragdoll	Macho	8	7,47
6C: Tita	Europeu comum	Fêmea	5	4
7C: Mia	Europeu comum	Fêmea	4,5	3,6
8C: Joe	Europeu comum	Macho	4	3,5
9C: Ginja	Europeu comum	Fêmea	18	4
10C: Fera	Europeu comum	Macho	5	3,7

Anexo V – Descrição do grupo de animais com GECF (E) com base na raça, idade, sexo, peso (kg), cronicidade dos sinais clínicos e procedimento realizado.

Grupo Estudo						
Gato	Raça	Sexo	Idade (anos)	Peso (kg)	Cronicidade dos sinais clínicos	Procedimento realizado
1E: Sussy	Europeu comum	Fêmea	13	2,89	4 meses	Extrações parciais
2E: Margarida	Europeu comum	Fêmea	13	3,5	1 ano	Extrações parciais
3E: Michaux	Europeu comum	Macho	4	5	9 meses	Extrações totais
4E: Miky	Europeu comum	Macho	3	5	2 anos	Extrações parciais + incisivos mandibulares
5E: Sachimi	Europeu comum	Fêmea	11	4,2	1 ano	Extraçãoe parciais
6E: Kiko FMV	Europeu comum	Macho	9	3,35	2 anos	Extrações parciais + incisivos mandibulares
7E: Lola	Europeu comum	Fêmea	5	2,5	1 ano	Extrações totais
8E: Carocha	Europeu comum	Fêmea	4	4,7	1 ano	Extrações parciais
9E: Afoito	Europeu comum	Macho	9	3,2	1 ano	Extrações parciais + todos os caninos
10E: Kenzo	Europeu comum	Macho	2	4,7	7 meses	Extrações parciais

Anexo VI - Classificações individuais de sinais clínicos pelos tutores recolhidas ao longo

	Animal	Dias pós-operatórios			p-value
		0	30	60	
Apetite	E1	3	3	3	0,143
	E2	2	1	2	
	E3	0	0	0	
	E4	2	2	2	
	E5	3	3	0	
	E6	1	3	1	
	E7	2	0	0	
	E8	0	0	0	
	E9	1	0	0	
	E10	1	2	0	
Nível de atividade	E1	3	2	3	0,386
	E2	3	3	2	
	E3	0	0	0	
	E4	0	0	0	
	E5	2	2	2	
	E6	3	3	3	
	E7	3	1	1	
	E8	0	0	0	
	E9	3	1	1	
	E10	1	2	1	
Limpeza e Higiene	E1	3	0	2	0,027
	E2	3	2	2	
	E3	0	0	0	
	E4	0	0	0	
	E5	2	0	0	
	E6	3	3	2	
	E7	3	0	0	
	E8	2	2	2	
	E9	3	2	2	
	E10	2	3	0	
Conforto	E1	2	1	3	0,019
	E2	2	1	1	
	E3	1	1	0	
	E4	0	0	0	
	E5	2	0	0	
	E6	3	3	1	
	E7	2	1	0	
	E8	2	1	0	
	E9	3	3	2	
	E10	3	3	1	

do estudo através de questionário.

Anexo VII - Classificações individuais das avaliações visuais das lesões ao longo do estudo.

	Animal	Dias pós-operatórios			p-value
		0	30	60	
Estomatite caudal	E1	3,5	3,5	3,5	0,124
	E2	1,5	1	0,5	
	E3	3	3	3	
	E4	3,5	2,5	1,5	
	E5	3	3	3	
	E6	4	3	3	
	E7	4	3,5	3	
	E8	3	3	3	
	E9	3	3	3	
	E10	3	3	3	
Bucoestomatite	E1	2	1,5	1,5	0,269
	E2	0,5	0,5	0	
	E3	3	3,5	3,5	
	E4	3	2	1	
	E5	1,5	2	2	
	E6	3,5	2,5	2,5	
	E7	4	2	2	
	E8	1	1,5	1,5	
	E9	3,5	3	3	
	E10	2,5	3	2	
Área total das lesões	E1	5	4	4	0,099
	E2	5	4	2	
	E3	6	6	6	
	E4	6	5	3	
	E5	6	6	6	
	E6	6	5	5	
	E7	6	6	5	
	E8	5	5	5	
	E9	6	6	6	
	E10	4	4	4	

Anexo VIII – Folheto informativo do kit SAA-8 (ELISA) da Life Diagnostics, Inc.

CAT SERUM AMYLOID A (SAA) ELISA Life Diagnostics, Inc., Catalog Number: SAA-8

INTRODUCTION

SAA, a protein of ~12 kDa, is a positive acute phase reactant that circulates in blood mostly associated with high density lipoprotein (HDL). In cats, basal serum levels are 0.1 - 2 µg/ml but can increase several hundred-fold because of infection, disease or cancer.^{1,2}

PRINCIPLE OF THE ASSAY

The assay uses two different peptide-specific cat SAA antibodies; one for solid phase immobilization and the other, conjugated to horseradish peroxidase (HRP), for detection. Serum samples are first denatured by heating for 1 hour at 60°C. The denaturing step dissociates SAA from interfering factors. Subsequently, the denatured samples are diluted. Standards and diluted samples are incubated, in the microtiter wells, together with HRP conjugate for one hour. This results in SAA molecules being sandwiched between the immobilization and detection antibodies. The wells are then washed to remove unbound HRP-conjugate. TMB is added and incubated for 20 minutes. If SAA is present a blue color develops. Color development is stopped by addition of Stop solution, changing the color to yellow, and absorbance is measured at 450 nm. The concentration of SAA is proportional to absorbance and is derived from a standard curve.

MATERIALS AND COMPONENTS

Materials provided with the kit:

- SAA antibody coated 96-well plate (12 x 8-well strips)
- HRP Conjugate, 11 ml
- SAA stock (lyophilized)
- 20x Wash solution; TBS50-20, 50 ml
- Diluent; YD50-1, 2 x 50 ml
- TMB, TMB11-1, 11 ml
- Stop solution, SS11-1, 11 ml

Materials required but not provided:

- Pipettors and tips
- Distilled or deionized water
- Polypropylene or glass tubes
- Vortex mixer
- Water bath
- Absorbent paper or paper towels
- Plate incubator/shaker
- Plate washer
- Plate reader capable of measuring absorbance at 450 nm.
- Curve fitting software

STORAGE

The SAA stock should be stored at or below -20°C for optimum stability. The remainder of the kit should be stored at 2-8°C and the microtiter plate should be kept in a sealed bag with desiccant. Kits will remain stable for six months from the date of purchase.

GENERAL INSTRUCTIONS

1. All reagents should be allowed to reach room temperature before use.
2. Reliable and reproducible results will be obtained when the assay is carried out with a complete understanding of the instructions and with adherence to good laboratory practice.

3. The wash procedure is critical. Insufficient washing will result in poor precision and falsely elevated absorbance readings.
4. Laboratory temperature will influence absorbance readings. Our ELISA kits are calibrated using shaking incubators set at 150 rpm and 25°C. Performance of the assay at lower temperatures will result in lower absorbance values.

WASH SOLUTION PREPARATION

The wash solution is provided as a 20x stock. Prior to use, dilute the contents of the bottle (50 ml) with 950 ml of distilled or deionized water.

STANDARD PREPARATION

The stock vial contains lyophilized heat-treated SAA of known concentration (it must not be incubated at 60°C).

1. Reconstitute the stock with deionized or distilled water as described on the vial label. Mix gently several times over a period of 5 minutes.
2. Label 5 polypropylene tubes as 15, 7.5, 3.75, 1.88 and 0.94, ng/ml.
3. Into the tube labeled 15 ng/ml, pipette the volume of diluent detailed on the stock vial label. Then add the indicated volume of stock and mix gently. This provides the 15 ng/ml standard.
4. Dispense 250 µl of diluent into the tubes labeled 7.5, 3.75, 1.88 and 0.94 ng/ml.
5. Prepare the 7.5 ng/ml standard by mixing 250 µl of the 15 ng/ml standard with 250 µl of diluent in the tube labeled 7.5 ng/ml.
6. Similarly prepare the remaining standards by two-fold serial dilution.

Unused reconstituted stock should be frozen at or below -20°C if future use is intended.

SAMPLE PREPARATION

Denaturation

1. Dispense 100 µl of each serum sample into a polypropylene microcentrifuge tube and tightly seal.
2. Incubate the samples at 60°C in a water bath for one hour.

Dilution

1. After denaturation, dilute the denatured samples at least 50-fold with the diluent provided with the kit.

ASSAY PROCEDURE

1. Secure the desired number of 8-well strips in the holder. Unused strips should be stored in the re-sealed bag with desiccant at 2-8°C for future use.
2. Dispense 100 µl of standards and samples into the wells (we recommend that standards and samples be run in duplicate).
3. Add 100 µl of HRP-conjugate into each well.
4. Incubate on a plate shaker at 150 rpm and 25°C for one hour.
5. Empty and wash the microtiter wells 5x with 1x wash solution using a plate washer (400 µl/well).
6. Strike the wells sharply onto absorbent paper or paper towels to remove all residual droplets.
7. Dispense 100 µl of TMB into each well.
8. Incubate on an orbital micro-plate shaker at 150 rpm at 25°C for 20 minutes.

9. After 20-minutes, stop the reaction by adding 100 μ l of Stop solution to each well.
10. Gently mix. It is important to make sure that all the blue color changes to yellow.
11. Read absorbance at 450 nm with a plate reader within 5 minutes.

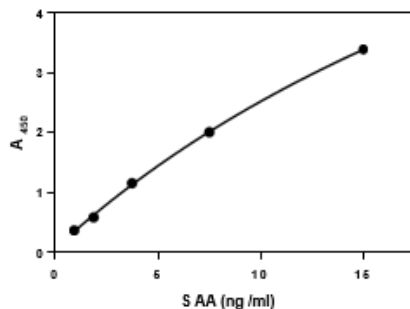
CALCULATION OF RESULTS

1. Using curve fitting software, construct a standard curve by plotting absorbance values of the standards versus concentration.
2. Fit the standard curve to an appropriate model and derive the concentration of the samples (we recommend using a single site, total and nonspecific binding model).
3. Multiply the derived concentration by the dilution factor to determine the actual concentration in the serum sample.
4. If the A_{450} values of samples fall outside the standard curve, samples should be diluted appropriately and re-tested.

TYPICAL STANDARD CURVE

A typical standard curve with absorbance at 450 nm on the Y-axis against SAA concentrations on the X-axis is shown below. This curve is for illustration only.

SAA (ng/ml)	A_{450}
15	3.379
7.5	1.999
3.75	1.148
1.88	0.580
0.94	0.363



ASSAY CHARACTERISTICS

Typical results obtained with eight American short-haired cat serum samples are shown in the following table. Samples were heated at 60°C for one hour then diluted as indicated and concentrations (ng/ml) determined. Serum concentrations (SC, μ g/ml) were calculated by multiplying the concentrations of the samples by their respective dilution factors. Average values, standard deviation (SD) and coefficient of variation (CV) were then calculated.

Sample	Dilution	A_{450}	ng/ml	μ g/ml	Average (μ g/ml)	SD (μ g/ml)	CV
1	50	1.281	3.76	0.19	0.18	0.01	5.3
	100	0.698	1.73	0.17			
	200	0.431	0.85	0.17			
	400	0.295	0.42				
2	50	1.078	3.04	0.15	0.13	0.02	11.7
	100	0.575	1.32	0.13			
	200	0.353	0.60	0.12			
	400	0.244	0.26				
3	400	2.914	12.19	4.88	4.52	0.52	11.4
	800	1.705	6.20	4.96			
	1600	0.875	2.75	4.40			
	3200	0.472	1.20	3.84			
4	400	2.345	8.03	3.21	2.90	0.27	9.1
	800	1.289	3.79	3.03			
	1600	0.683	1.68	2.69			
	3200	0.425	0.83	2.67			
5	4000	2.111	8.08	32.25	26.96	4.69	17.4
	8000	1.095	3.63	29.02			
	16000	0.570	1.57	25.10			
	32000	0.330	0.67	21.46			
6	4000	2.663	10.82	43.28	39.18	5.09	13.0
	8000	1.509	5.35	42.82			
	16000	0.784	2.39	38.29			
	32000	0.421	1.01	32.33			
7	4000	3.680	15.48		74.36	7.71	10.4
	8000	2.722	9.80	78.37			
	16000	1.600	4.95	79.25			
	32000	0.792	2.05	65.47			
8	4000	3.799	16.40		82.91	12.06	14.5
	8000	3.103	11.79	94.34			
	16000	1.679	5.26	84.10			
	32000	0.836	2.20	70.30			

REFERENCES

1. Matulova M, et al. Chicken innate immune response to oral infection with *Salmonella enterica* serovar Enteritidis. *Veterinary Research*. 44:37 (2013)
2. Alilar AA. et al. Chronic amyloid arthropathy and increased serum amyloid levels in brown layers. *Bull Vet Inst Pulawy*. 50:557-560 (2006)

Rev 121417

For technical assistance please email us at
techsupport@lifediagnosics.com

Anexo IX – Leitura das absorvâncias e respetivo tratamento dos resultados para obtenção da reta de calibração dos valores padrão e das concentrações de SAA das amostras recolhidas no presente estudo (µg/ml).

concentração dos padrões (ng/ml)	Média de Abs450				
0,94	0,30745				
1,88	0,4208				
3,75	0,7479				
7,5	1,058				
15	1,49905	Concentração (ng/ml)	x fator diluição	Concentração µg/ml	arredondamento
2c	0,80925	5,841756919	584,1756919	0,584175692	0,584
9c	0,1883	-1,630565584	-163,0565584	-0,163056558	-0,163
10c	0,37305	0,592659446	59,26594465	0,059265945	0,059
C1	0,37305	0,592659446	59,26594465	0,059265945	0,059
C2	0,4194	1,150421179	115,0421179	0,115042118	0,115
C3	0,1783	-1,750902527	-175,0902527	-0,175090253	-0,175
C4	0,13265	-2,300240674	-230,0240674	-0,230024067	-0,23
C5	0,0807	-2,925391095	-292,5391095	-0,29253911	-0,293
C6	4	44,23826715	4423,826715	4,423826715	4,424
C7	0,59305	3,240072202	324,0072202	0,32400722	0,324
C8	0,1087	-2,588447653	-258,8447653	-0,258844765	-0,259
C9	0,1033	-2,653429603	-265,3429603	-0,26534296	-0,265
C10	0,3773	0,643802647	64,38026474	0,064380265	0,064
2E 0	4	44,23826715	4423,826715	4,423826715	4,424
2E 30	0,13245	-2,302647413	-230,2647413	-0,230264741	-0,23
2E 60	0,1553	-2,027677497	-202,7677497	-0,20276775	-0,203
3E 0	0,3813	0,691937425	69,19374248	0,069193742	0,069
3E 30	0,23235	-1,100481348	-110,0481348	-0,110048135	-0,11
3E 60	0,65985	4,043922984	404,3922984	0,404392298	0,404
4E 0	4	44,23826715	4423,826715	4,423826715	4,424
4E 30	4	44,23826715	4423,826715	4,423826715	4,424
4E 60	0,49545	2,065583634	206,5583634	0,206558363	0,207
5E 0	4	44,23826715	4423,826715	4,423826715	4,424
5E 30	0,4379	1,373044525	137,3044525	0,137304452	0,137
5E 60	0,1016	-2,673886883	-267,3886883	-0,267388688	-0,267
6E 0	4	44,23826715	4423,826715	4,423826715	4,424
6E 30	4	44,23826715	4423,826715	4,423826715	4,424
6E 60	4	44,23826715	4423,826715	4,423826715	4,424
8E 0	4	44,23826715	4423,826715	4,423826715	4,424
8E 30	3,6571	40,11191336	4011,191336	4,011191336	4,011
8E 60	4	44,23826715	4423,826715	4,423826715	4,424
9E 0	4	44,23826715	4423,826715	4,423826715	4,424
9E 30	4	44,23826715	4423,826715	4,423826715	4,424
9E 60	4	44,23826715	4423,826715	4,423826715	4,424
10E 0	4	44,23826715	4423,826715	4,423826715	4,424
10E 30	2,0603	20,89651023	2089,651023	2,089651023	2,09
10E 60	4	44,23826715	4423,826715	4,423826715	4,424
11E 0	4	44,23826715	4423,826715	4,423826715	4,424
11E 30	4	44,23826715	4423,826715	4,423826715	4,424
11E 60	4	44,23826715	4423,826715	4,423826715	4,424
12E 0	4	44,23826715	4423,826715	4,423826715	4,424
12E 30	4	44,23826715	4423,826715	4,423826715	4,424
12E 60	4	44,23826715	4423,826715	4,423826715	4,424

Anexo X – Reta de calibração dos valores das concentrações padrão de SAA fornecidas no kit SAA-8.

